



HAL
open science

Etude des conséquences d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil sur l'intégrité d'un modèle in vitro de barrière hématoencéphalique : les processus inflammatoires et hypoxiques associés

Anne-Cloé Voirin

► To cite this version:

Anne-Cloé Voirin. Etude des conséquences d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil sur l'intégrité d'un modèle in vitro de barrière hématoencéphalique : les processus inflammatoires et hypoxiques associés. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSES063 . tel-02497564

HAL Id: tel-02497564

<https://theses.hal.science/tel-02497564v1>

Submitted on 3 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° D'ordre NNT : 2019LYSES063

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de

Faculté de Médecine de l'Université Jean Monnet de Saint – Etienne

Ecole doctorale EDSIS 488

Ecole doctorale sciences-ingénierie-santé de Lyon

Spécialité du Doctorat : Biologie cellulaire

Discipline : Neurophysiologie

Soutenue publiquement le 19 décembre 2019, par :

Anne-Cloé VOIRIN

Etude des conséquences d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de barrière hématoencéphalique : les processus inflammatoires et hypoxiques associés

Devant le jury composé de

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier Xavier Declèves Université Paris Descartes –Paris Diderot	Rapporteur
Docteur Jean-François Gherzi-Egea Directeur de Recherche INSERM Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Docteur Hind Hamzeh-Cognasse Université Jean Monnet	Examinatrice
Professeur Vincent Berezowski Université Lille Nord	Examineur
Docteur Caroline Mysiorek Université d'Artois	Examinatrice
Docteur Anne Briançon-Marjollet Université de Grenoble	Invitée
Professeur des Universités, Praticien hospitalier Frédéric ROCHE Université Jean-Monnet	Directeur
Professeur Nathalie PEREK Université Jean Monnet	Co-directrice



N° D'ordre NNT : 2019LYSES063

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de

Faculté de Médecine de l'Université Jean Monnet de Saint – Etienne

Ecole doctorale EDSIS 488

Ecole doctorale sciences-ingénierie-santé de Lyon

Spécialité du Doctorat : Biologie cellulaire

Discipline : Neurophysiologie

Soutenue publiquement le 19 décembre 2019, par :

Anne-Cloé VOIRIN

Etude des conséquences d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de barrière hématoencéphalique : les processus inflammatoires et hypoxiques associés

Devant le jury composé de

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier Xavier Declèves Université Paris Descartes –Paris Diderot	Rapporteur
Docteur Jean-François Ghersi-Egea Directeur de Recherche INSERM Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Docteur Hind Hamzeh-Cognasse Université Jean Monnet	Examinatrice
Professeur Vincent Berezowski Université Lille Nord	Examinateur
Docteur Caroline Mysiorek Université d'Artois	Examinatrice
Docteur Anne Briançon-Marjollet Université de Grenoble	Invitée
Professeur des Universités, Praticien hospitalier Frédéric ROCHE Université Jean-Monnet	Directeur
Professeur Nathalie PEREK Université Jean Monnet	Co-directrice

Remerciements

Cette thèse est le fruit de trois années de travail au sein de l'équipe de recherche Système Nerveux Autonome –Epidémiologie – Physiologie, Ingénierie, Santé (SNA-EPIS).

A mes directeurs de thèse

Le professeur **Frédéric Roche**

Merci pour l'intérêt et l'enthousiasme que vous avez accordé à ce travail. Je tenais à vous remercier, pour la confiance que vous m'avez accordée au sein du laboratoire SNA-EPIS, ainsi que les responsabilités (notamment dans l'enseignement) que vous m'avez données, qui m'ont enrichie professionnellement et personnellement. Merci pour votre disponibilité durant ce travail, pour la richesse de nos échanges et les conseils prodigués, qui m'ont permis de mieux appréhender les liens existant entre la clinique et le fondamental. Veuillez trouver dans ce travail, mon sincère respect.

Le Professeure **Nathalie Perek**

Merci pour la confiance et les conseils que vous m'avez apportés durant ces 3 années de thèse, que ce soit sur un plan scientifique ou à travers les enseignements que j'ai pu réaliser sous votre supervision. Merci pour votre présence et votre écoute au cours de cette thèse. Veuillez trouver dans ce travail, le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A mes rapporteurs

Le Professeur **Xavier Declèves**

C'est un grand honneur et un plaisir de vous compter parmi ce jury. Je vous remercie d'avoir acceptée de rapporter ce travail de recherche. Votre connaissance est un avantage pour améliorer ce travail. Permettez-moi de vous témoigner mes sincères

remerciements à travers ces quelques mots. En espérant que vous aurez l'occasion de visiter mes belles Vosges un jour.

Le Docteur **Jean-François Gherzi-Egea**

C'est un immense plaisir et un honneur pour moi de vous compter parmi mon jury de thèse, et je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit. Votre expertise va être bénéfique et conduira à des échanges qui seront très productifs. Veuillez trouver dans ce témoignage mes sincères remerciements ainsi que ma profonde reconnaissance.

A mes examinateurs

Le Professeur **Vincent Berezowski**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail de thèse. Vos compétences dans le domaine de la barrière hématoencéphalique en condition pathologique permettra j'en suis sûr des échanges enrichissants. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Le Docteur **Caroline Mysiorek**

Merci infiniment d'avoir accepté de juger ce travail de recherche. Vos compétences dans la réalisation de modèle de BHE *in vitro* sont essentielles pour ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance pour votre implication dans cette thèse depuis 2 ans. Merci d'avoir soulevé des questions, toujours pertinentes, au cours de mes comités de suivi de thèse, ce qui a permis l'amélioration de cette thèse.

Le Docteur **Anne Briançon-marjollet**

Merci infiniment d'avoir accepté de relire ce travail de recherche. Votre expertise dans le domaine de l'hypoxie intermittente est un atout pour ce travail. Je tenais également à vous remercier de m'avoir accepté au sein de votre laboratoire Grenoblois et de m'avoir aiguillé dans mes recherches sur les effets hypoxiques. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Le Docteur **Hind Cognasse**

Je vous remercie infiniment d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Votre expertise dans les réponses inflammatoires va permettre un échange très intéressant sur cette thématique. C'est un honneur et un plaisir que vous soyez examinatrice de cette thèse, et ce, dans la continuité de ces 3 dernières années de thèse au cours duquel vous avez su me donner de précieux conseils, et échanger sur de nombreux points lors de mes comités de suivi de thèse. Veuillez recevoir le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Je souhaite remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ces 3 années passé à Saint-Etienne.

Je remercie l'ensemble des membres **de mon équipe d'accueil SNA-EPIS**, merci à tous pour les échanges que nous avons pu avoir au sein des réunions du mercredi midi. J'ai conscience que pour vous, ce que l'on fait avec nos cellules peut être très éloigné de vos recherches, mais j'espère que vous aurez quand même appris quelques trucs sur la culture cellulaire. Avec en particulier un merci à **Sébastien** de m'avoir aidé dans les données des patients. Et à **Chloé**, nouvelle arrivante à qui je souhaite la réussite de son très beau projet de thèse.

Je remercie le Professeur **Léonard FEASSON**, merci sans vous je ne serais peut-être jamais venue à Saint-Etienne et je n'en serais peut-être pas là aujourd'hui. Je vous remercie également pour votre soutien, et pour votre confiance. Ce fut un honneur d'enseigner à vos côtés.

Je remercie également le Docteur **Alain Guignandon**, (Laboratoire SAINBIOSE) et le docteur **Zhiguo He** (laboratoire BIIGC), chacun à votre manière et dans votre domaine, vous avez su m'aider pour avancer dans cette thèse.

A mes amis et compatriote de thèse au cours de ces 3 années :

A **Angèle**, merci pour tous les bons moments au labo, à la coloc, dans St-Etienne, au bord de la mer à St Michel-chef-chef, à Annecy, ... ne nous restes plus que le Canada pour se voir. Merci d'avoir été ci sociable et de m'avoir permis de ne pas rester l'Hermite de ma campagne.

A **David**, merci grâce à toi mes pauses midi ont été un pur plaisir, je me souviendrai surtout des pizzas chorizo, de nos discussions « course à pied », d'une gallinette cendrée, et de nos pauses quatre heures avec l'amie **Anne-So** (la surfeuse du bout du monde qui boit du Fanta citron)... bon vent à vous deux, je ne doute pas que l'on se reverra.

A **Cindy**, que dire de toi, sans toi cette dernière année aurait été longue, grâce à toi elle a été bien trop courte. Je ne te remercie pas pour Baby Shark, mais je te remercie de me faire rire autant tous les jours depuis 8 mois. Je te remercie d'être la collègue de bureau que j'aurais voulu avoir depuis le début. Merci cochon, pour les bruits bizarres, les insultes gratuites, les pintes de bières, ou de cidres, ... bref merci d'être comme tu es, surtout change pas et prends soin de toi et de ton chat évidemment.

A **Clémentine** et **Morgane**, merci de m'avoir transmis vos « bébé » modèles et de m'avoir appris ce que je sais aujourd'hui de la culture cellulaire. Petite dédicace à Clémentine, je me souviendrai longtemps de Lille, bonne route vers les Etats-Unis.

A **Marie**, je me souviendrai de « gratte jambe », je te laisse avec la laide et je te souhaite du courage avec elle et pour la fin de ta thèse.

A **Agnès**, **Pierrot** et **Mich-Mich**, merci pour les pauses midis à parler de tout et de rien, à boire des bières aux Cross-road. Bon courage dans la réussite de vos projets respectifs.

A **Corantin** et **Samy**, merci les gars pour toutes nos discussions, merci d'être venu courir avec moi dans mon jardin, je vous souhaite de réussir tous vos projets.

A tous mes ami(e)s, qui m'ont permis le temps des weekends de m'aérer dans les montagnes que nous aimons tant.

Merci aux Nulles pour les plus de 20 années passé à vos côtés : **Mim et Maé**, pour les sorties ski de fond, le sortilège, et le squattage d'appart à Grenoble. **Perrine** pour les trails et autres courses couru(e)nt en ta compagnie, bon vent en NZ mais revient quand même. **Marine** merci pour tes rires, et d'avoir agrandi la famille des nulles avec ta magnifique carotte. Plein d'amour sur vous.

Merci **Clémence**, toi qui aura partagé mes années d'études, ma passion des sciences, avec qui j'aurai voyagé et rencontré des gens formidables, ...

Merci à **mes parents, mon frère et mes sœurs**, je n'ai rien à vous dire que vous ne sauriez déjà. Je sais que malgré nos caractères parfois conflictuels, je peux compter sur chacun d'entre vous.

Merci **Vianney**, 6 ans que tu me supportes, que l'on partage nos aventures, que l'on voyage, après 6 ans plus ou moins loin il est temps de vivre ensemble alors...
COURAGE !

Enfin merci à **toi** de lire ces pages, j'espère que tu y trouveras les réponses à tes questions et les connaissances que tu voulais.

Liste des publications et communications

Article soumis

Obstructive Sleep Apnea Patient Serum Contributes to an Alteration of a Human Blood-Brain Barrier Model Integrity AC.VOIRIN, S.CELLE, N.PEREK, F. ROCHE

Soumis dans la revue scientific report

Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells *in vitro* BBB model. AC.VOIRIN, N.PEREK, F. ROCHE

Soumis dans la revue Brain research (en révision)

Article en préparation

Effect of chronic intermittent hypoxia on the integrity of a BBB model: comparison of two induction methods and their inhibitions. AC.VOIRIN, M.CHATARD, N.PEREK, A.BRIANCON-MARJOLLET, F.ROCHE

Communications orales

Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells *in vitro* BBB model. AC.VOIRIN, N.PEREK, F. ROCHE.

21st international Symposium on signal transduction at the BBB – ARAD (Roumanie)
– sept 2018

Obstructive Sleep Apnea Patient Serum Contributes to an Alteration of a Human Blood-Brain Barrier Model Integrity AC.VOIRIN, S.CELLE, N.PEREK, F. ROCHE.

Société du cerveau et des maladies cérébrovasculaires (SCMC) – communication orale
– Lille - mars 2019

Communications affichées

Effet de l'apnée du sommeil sur l'intégrité de la barrière hématoencéphalique : mécanismes pro-inflammatoire AC.VOIRIN, N.PEREK, F. ROCHE.

Journée de l'école doctorale EDSIS488 – Poster vulgarisé – juin 2018

Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells *in vitro* BBB model. AC.VOIRIN, N.PEREK, F. ROCHE.

Société pour l'étude des interfaces sang cerveau – Poster – Paris - novembre 2018

Effect of chronic intermittent hypoxia on the integrity of a BBB model: comparison of two induction methods and their inhibitions. AC.VOIRIN, M.CHATARD, N.PEREK, A.BRIANCON-MARJOLLET, F.ROCHE.

Société d'étude des interfaces sang cerveau – Poster – Orsay - novembre 2019

Vulgarisation scientifique

La barrière hématoencéphalique – Dessine-moi ta science - Ramène ta Science Mai 2017 et Mai 2018

L'apnée du sommeil – Dessine-moi ta science - Le village des sciences Octobre 2017

Travail de master

Central fatigue kinetics in knee extensors muscle during a sustained low-intensity contraction to task failure R.SAURON, AC.VOIRIN, D.KENNOUCHE, L.ESPEIT, G.Y.MILLET, T.RUPP, T LAPOLE Conference Paper, European Congress of Sport Science Mars 2019 Prague. (*En cours de soumission*)

Encadrement d'étudiant :

FERRET Amandine : étudiant de BTS 1^{ère} et 2^{ème} année (juin 2017 et novembre-décembre 2017) Essai de microscopie électronique à transmission sur insert.

SUAD Nimale : étudiante écossaise de licence 3^{ème} année (février 2018 – avril 2018)

DELFOSSÉ Maximilien : étudiant de Master 1 (avril 2018 – juin 2018)

GRANGE Elise : étudiant de BTS 1^{ère} et 2^{ème} année (juin 2018 et novembre – décembre 2018) : Mise en place d'un protocole d'imagerie sur insert d'un modèle de co-culture de barrière hématoencéphalique.

Résumé et mots clés

Mots clés : Barrière hématoencéphalique – modélisation *in vitro* – syndrome d'apnée obstructive du sommeil – jonctions serrées – ABC-transporteurs.

Résumé : Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est un enjeu majeur en santé publique. Il est défini par des collapsus répétés des voies aériennes supérieures associés à une majoration du risque cérébrovasculaire. A ce jour, le traitement le plus efficace est un dispositif de pression positive continue nocturne, dont l'observance à long terme est limitée. Afin de développer d'autres thérapeutiques, il est nécessaire de comprendre les mécanismes sous-jacents ainsi que leurs impacts au niveau du système nerveux central (SNC). Dans ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que les déficits cognitifs seraient liés à une altération de la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette barrière est composée d'un endothélium étanche, qui est associé aux cellules du compartiment cérébral tels que les astrocytes, pour permettre de limiter l'entrée et/ou de favoriser la sortie de composés cytotoxiques, protégeant ainsi le SNC. Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des protéines de jonctions telles que ZO-1 et Claudin-5. Mais elles possèdent également un système de transports d'efflux actif, appartenant à la famille des ABC-transporteurs tels que MRP-1, P-gp, BCRP. L'objectif premier de cette thèse, fut d'évaluer l'impact individuel de deux mécanismes sous-jacents du SAOS, c'est-à-dire l'hypoxie intermittente chronique par l'intermédiaire de la voie HIF-1 et l'inflammation persistante de bas grade, via l'utilisation de cytokines proinflammatoires connues pour leurs implications dans le SAOS, sur l'intégrité d'un modèle de BHE. Enfin nous avons réalisé une approche translationnelle d'étude du SAOS, grâce à l'utilisation de sérums de patients permettant de déterminer l'effet des sérums de patient sur un modèle de BHE *in vitro*. L'étanchéité de l'endothélium est évaluée par des mesures de perméabilité au Sodium fluorescéine, ainsi que des ELISA sur cellules entières d'expression des protéines de jonctions serrées et des ABC-transporteurs. Enfin une mesure de l'activité de ces ABC-transporteurs a été réalisée. Nous avons observé une perte d'intégrité de la BHE suite aux différents stress. Nous montrons que l'hypoxie intermittente chronique entraîne une possible adaptation cellulaire et que l'inhibition de la voie hypoxique ne

permet pas d'annuler entièrement les conséquences de l'hypoxie sur l'intégrité de la BHE. Ainsi d'autres voies que celle d' HIF-1 interviendraient dans ce processus de perméabilité de la barrière telle que l'inflammation. Enfin notre étude confirme que les serums de patients atteint d'un SAOS, induisent une augmentation de la perméabilité de la BHE. Ces diverses observations confirment la complexité du SAOS, et l'importance de l'étude des mécanismes individuels pour la recherche de nouvelles thérapeutiques.

Keywords: Blood-brain barrier model – obstructive sleep apnea syndrome – tight junction – ABC-transporter

Abstract:

Obstructive sleep apnea syndrome (OSA) is a major public health issue. It's defined as repeated upper airway collapse associated with enhanced cerebrovascular risk. Nowadays, the most effective treatment is a continuous positive airway pressure device, but long term compliance could be limited. In order to develop alternative therapies, it appears necessary to better understand the underlying deleterious mechanisms and their impacts on the central nervous system (CNS). In this thesis we hypothesize that neurodegenerative consequences of OSA are mainly related to an alteration of the blood-brain barrier (BBB). This barrier is composed of a tight endothelium, which is combined with brain compartment cells such as astrocytes, to limits the entry and/or promotes the exit of cytotoxic compounds, thus protecting the CNS.

The first objective of this topic was to assess the individual impact of two underlying mechanisms of OSA, i.e. chronic intermittent hypoxia and persistent low-grade inflammation on the integrity of an *in vitro* BBB model. Finally, we have evaluated a "global" approach to OSA using patient sera to determinate the effect of circulating biomarkers on an *in vitro* BBB model.

The tightness of the endothelium is evaluated by Na-Fl permeability measurements, as well as cell-ELISA for tight junction proteins and ABC-transporters expression. Finally a measurement of ABC-transporters activity was performed.

We demonstrate a loss of BBB integrity due to different stresses. We show that intermittent hypoxia leads to cellular adaptation and the use of an inhibitor of the main recognized HIF-1 alpha pathway does not induce a complete reversion on the integrity of the BBB. Then, other pathways would be involved in BBB alteration, such as inflammation. Therefore, we show inflammatory stress apply to our *in-vitro* BBB model lead a loss of integrity. Finally, we demonstrate that patient's sera with severe OSA induce an increase in the permeability of our human BBB model. Those results confirm the complexity of OSA pathophysiology, and the importance of studying individual mechanisms for the search of new therapies

Table des matières

Remerciements	3
Liste des publications et communications.....	9
Résumé et mots clés	13
Table des figures	21
Table des abréviations.....	25
Avant-propos.....	27
Première partie :	29
Étude bibliographique	29
Chapitre 1 : Le syndrome d’apnée obstructive du sommeil.....	31
1. Historique	31
2. Définition et prévalence	32
3. Facteurs de risque	34
4. Traitement	35
5. Mécanismes physiologiques associés.....	35
6. Etudes cliniques associées: cohorte PROOF.....	45
Chapitre 2 : L’unité neurovasculaire (ou NVU).....	49
1. Historique	50
2. L’Endothélium cérébral microvasculaire	52
3. Les astrocytes	75
4. Péricytes	77
5. Les Neurones	78

6. La Microglie	79
7. La membrane basale/lame basale	79
8. La modélisation <i>in vitro</i>	80
Chapitre 3 : Mécanismes impliqués dans le SAOS et la barrière hématoencéphalique	93
1. L'hypoxie intermittente et la BHE	93
2. L'inflammation et la BHE	98
Conclusion de la revue bibliographique	107
Deuxième partie : Travaux personnels	109
Objectif de la thèse	111
Etude 1 : Altération (et limitation ?) de l'intégrité endothéliale d'un modèle <i>in vitro</i> de BHE, après exposition à un stress hypoxique intermittent en présence ou non d'inhibiteur de la voie HIF-1 α	113
1. Introduction	113
2. Matériels et méthodes.....	114
3. Résultats	119
4. Discussion	126
Etude 2 : Altération de l'intégrité de l'endothélium cérébrale d'un modèle <i>in vitro</i> de BHE soumis à un stress inflammatoire chronique.....	131
1. Introduction	131
2. Matériels et méthodes.....	133
3. Résultats	133
4. Discussion	134
5. Article.....	134
Etude 3 : Altération de la barrière endothéliale liée à l'exposition aux sérums de patients atteint d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil	159
1. Introduction	159
2. Matériels et Méthodes	160

3. Résultats	161
4. Discussion	162
5. Articles	162
Conclusion des travaux personnels	185
Troisième partie : Discussion générale et perspectives.....	187
Discussion générale	189
Perspectives	192
Perspectives personnelles	197
Bibliographie.....	199

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique des étapes de la recherche sur le syndrome d'apnée du sommeil.	32
Figure 2 : Illustration schématique de la voie HIF-1 que ce soit en normoxie ou en hypoxie.....	39
Figure 3 : représentation de la structure du TNF- α et des ces 2 principaux récepteurs le TNFR1 et TNFR2 d'après Maiorov et al. (Guyen-Maiorov et al., 2014).....	43
Figure 4 : Représentation de la structure du complexe IL-6 / IL-6R / gp130, nécessaire la transduction du signal d'après Abeywardena et al. (Abeywardena et al., 2009) ...	44
Figure 5 : Représentation schématique des étapes de la recherche ayant menées à la structuration sous forme d'unité neurovasculaire	51
Figure 6 : Structure de l'unité neurovasculaire multicellulaires d'après Parashar et al (Parashar et al., 2012).....	53
Figure 7 : Représentation des différents systèmes de transport à travers l'endothélium cérébral de la BHE d'après Gosselet et al. (Gosselet et al., 2011).....	54
Figure 8 : Schéma représentatif de la voie paracellulaire et des interactions entre les protéines de jonctions serrées après modification de Abbott 2006 (Abbott et al., 2006).	56
Figure 9 : Structure des protéines de type Claudines d'après Schneeberger et al (Schneeberger and Lynch, 2004). s.....	57
Figure 10 : Structure des protéines Occludines d'après Schneeberger et al (Schneeberger and Lynch, 2004). s.....	58
Figure 11 : Représentation des différents complexes de jonctions.....	62
Figure 12 : Illustration schématique des mécanismes de transport transcellulaire retrouvés au niveau de la BHE modifiée par Abbott et al (Abbott et al., 2006).....	65
Figure 13 : L'illustration schématique des mécanismes de transport transcellulaire retrouvés au niveau de la BHE modifiée par Abbott et al (Abbott et al., 2006).....	66
Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme de détoxification cellulaire impliquant les ABC-transporteurs.	67

Figure 15 : Illustration de la topologie des transporteurs de la famille des ABCC et ABCB1 qui n'est autre que la protéine P-gp d'après Declèves et Legrand (Declèves, 2009).	70
Figure 16 : Illustration de la topologie des transporteurs de la famille des ABCC dont le ABCC1 qui n'est autre que la MRP-1 d'après Declèves et Legrand (Declèves, 2009).	71
Figure 17 : Illustration de la topologie de la protéine de transport ABCG2 ou encore connue sous le nom de BCRP d'après Declèves et Legrand (Declèves, 2009).	73
Figure 18 : Illustration des interactions entre l'endothélium et son environnement cellulaire d'après Abbott et al (Abbott et al., 2010).	75
Figure 19 : Photo de l'appareil de mesure de la résistance électrique transendothelial utilisé pour valider les modèles <i>in vitro</i> mis en place.	82
Figure 20 : Représentation schématique des différentes conformations de culture cellulaire sur insert.	84
Figure 21 : Représentation schématique des différentes conformations de co-culture.	86
Figure 22 : Illustration schématique de la mise en place du modèle <i>in vitro</i> de co-culture en contact d'une BHE murine.	88
Figure 23 : Illustration schématique du modèle <i>in vitro</i> de coculture en milieu conditionnée de BHE humaine.	90
Figure 24 : Illustration schématique de la voie HIF-1 que ce soit en normoxie ou en hypoxie.	96
Figure 25 : Structure de l'IL-17 et de son interaction avec ses récepteurs IL-17 RA et RC, ainsi que son action synergique avec le TNF- α sur la production d'IL-6 d'après Miossec et al. (Miossec and Kolls, 2012).	103
Figure 26 : Illustration schématique de la mise en place du modèle de coculture <i>in vitro</i> de BHE, avec dans le compartiment luminal les cellules endothéliales (gris foncé) et dans le compartiment abluminal les cellules astrocytaires (bleu).	115
Figure 27 : Représentation schématique des cycles hypoxiques induit par un agent chimique : l'hydralazine.	116
Figure 28 : Représentation schématique des cycles induit par une enceinte hermétique.	117
Figure 29 : Mesure de perméabilité membranaire apparente au Sodium Fluorescéine sur le modèle de coculture b.end.3/C6 après 3 cycles d'hypoxie intermittent induit par un agent chimique, l'hydralazine, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1)...	120

Figure 30 : Expression des protéines de jonctions serrées Zonula Occludens (ZO-1) et de Claudine-5 après 3 cycles d'hypoxie intermittent induit par un agent chimique, l'hydralazine, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1). 1.....	121
Figure 31 : Expression des ABC-transporteurs de type P-glycoprotéine (P-gp) et MRP-1 après 3 cycles d'hypoxie intermittent induit par un agent chimique, l'hydralazine, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1).....	122
Figure 32 : Mesure de perméabilité membranaire apparente au Sodium Fluorescéine sur le modèle de coculture b.end.3/C6 après 3 cycle d'hypoxie intermittent induit par une enceinte hermétique, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1).	123
Figure 33 : Expression des protéines de jonctions serrées Zonula Occludens (ZO-1) et de Claudine-5 après 3 cycle d'hypoxie intermittent induit par une enceinte hermétique, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1).....	125
Figure 34 : Expression des ABC-transporteurs de type P-glycoprotéine (P-gp) et MRP-1 après 3 cycles d'hypoxie intermittente induits par une enceinte hermétique, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1)..	126
Figure 35 : Représentation schématique des interactions complexes des mécanismes associés à un syndrome d'apnée du sommeil obstructif.	192

Table des abréviations

ABC: ATP binding cassette	IL-6: interleukine-6
AHI: Index Apnée-Hypopnée	IL-6R : récepteur de l'IL-6
AM: Astrocytes medium	IL-17 : interleukine-17
ARNT: aryl hydrocarbon nuclease translocator	IL-17RA/RC : Récepteur IL-17
ATP: Adénosine Tri-Phosphate	JAK/STAT: Janus Kinase / Signal transduction and activator of transcription
BCECF: 2',7' - bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester	JNK: c-Jun N-terminal kinases
BCRP: breast cancer resistance protein	LTH: Lymphocyte T Helper
B.End.3: Brain Endothelial cells (murine)	MAPK: Mitogen activated protein kinases
BHE: barrière hématoencéphalique	MDR: Multidrug resistance protein
C6: Astrocyte cells (murine)	MMP: Matrix Metalloproteinase
CLD-5: Claudine-5	MRP: Multidrug resistance-associated protein
CRP: Protein C Reactive	Na-Fl: Sodium fluorescéine
DMEM: dubelcco modified eagle medium	NBD: Nucleotide binding domain
DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle	NF-κB: Nuclear Factor κB
Medium: nutrient Mixture F-12	Occl: Occludine
GLUT-1: transporteur glucose-1	ODD: Oxygen Dependant Degradation
GSH: glutathion peroxidase	Papp: Perméabilité Apparente
HA: Human Astrocytes	PDZ: post synaptic density drosophila disc large tumor suppressor ZO-1 protein
HBEC-5i: Human brain endothelial cells	PHD: proly hydroxylase domain
HI: Hypoxie intermittente	Pi3K: phosphoinositide 3-kinase
HIF-1: hypoxia inducible factor-1	Pgp: P-glycoprotéine
HRE: hypoxia response element	PPC: Pression partiel continue
IL-1β: interleukine 1 β	PROOF: cohorte en population générale, évaluation prospective de

l'activité du système nerveux autonome comme indicateur pronostic d'événements cardiovasculaire et cérébrovasculaire
SAOS: syndrome d'apnée obstructive du sommeil
SLC: Solute Linked Carrier
SNC: système nerveux central
SVF: sérum de veau fœtal
TACE : enzyme de conversion du TNF- α
TEER: transendothelial electrical resistance
TJ: tight junction

TMD: transmembrane domain
TMH: transmembrane helice
TNF- α : tumor necrosis factor- α
TNFR : récepteur du TNF- α
NVU: unité neurovasculaire
VAS : voie aérienne supérieure
VE-cadherin: vascular endothelial-cadherin
VEGF: vascular endothelial growth factor
VHL: Van Hippel Lindau protein
YC-1: 3-(5'-hydroxyethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole
ZO: zonula occludens

Avant-propos

Le sommeil est un processus actif, qui permet la régulation de nombreuses fonctions vitales, que ce soit pour renforcer notre système immunitaire ou pour nettoyer le cerveau de ses toxines. On distingue principalement deux types de sommeil, le sommeil profond, réparateur et le sommeil paradoxal, plus lié aux rêves.

Mais imaginez-vous être cette personne qui se réveille régulièrement, qui doit reprendre sa respiration durant la nuit, comme une sensation d'étouffement répétée. Cette personne qui entend sans cesse « tu as ronflé cette nuit », cette personne qui se réveille encore plus fatiguée que la veille, et que cela arrive tous les jours, toutes les nuits... vous souffrez peut-être de ce que l'on appelle le syndrome d'apnée du sommeil.

Le syndrome d'apnée du sommeil impacte la qualité du sommeil en provoquant une fragmentation de ce dernier, associée à un manque d'oxygénation nocturne répété, entraînant alors une fatigue diurne et une augmentation des efforts respiratoires nocturnes. Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil est associé à de nombreux facteurs de risques cardiovasculaires et cérébrovasculaires, augmentant la comorbidité associée. Bien qu'encore difficile à diagnostiquer aujourd'hui en épidémiologie, le syndrome d'apnée du sommeil toucherait un grand nombre d'individus (près de 1 million de patients traités en France en 2019) avec une prévalence pouvant atteindre 50% dans certaines populations à haut risque. De plus, quand il est diagnostiqué le traitement le plus efficace est un masque facial permettant de délivrer une pression positive d'air continue grevant au long court l'observance. C'est pourquoi des recherches se développent afin d'améliorer les connaissances sur cette pathologie. Il s'agit d'un désordre respiratoire nocturne complexe, impliquant de nombreux mécanismes tel que l'hypoxie intermittente chronique, l'inflammation systémique de bas grade, affectant de nombreux organes comme le cœur ou les vaisseaux sanguins et souvent associé à d'autres pathologies telles que l'obésité, le diabète. Alors par où commencer ?

Au sein du laboratoire SNA-EPIS, cela fait plus de six ans que nous avons choisi d'explorer les conséquences cérébrales de ce désordre, et de s'attarder notamment sur l'une des structures protectrices du compartiment cérébral, qu'est l'interface sang-cerveau, autrement dit l'unité neurovasculaire ou plus communément appelée la barrière hématoencéphalique. Cette interface est un lieu d'échanges entre le flux sanguin et ses composés et le cerveau. C'est un lieu de régulation, avec un endothélium micro-vasculaire qui limite l'entrée et/ou favorise la sortie des composés potentiellement cytotoxiques, ce qui permet de limiter leurs actions délétères au niveau des structures cérébrales et donc de limiter le déficit cognitif. Or, chez des personnes atteintes d'un syndrome d'apnée du sommeil, il est souvent observé à long terme des déficits neurocognitifs importants. Il apparaît donc intéressant et cohérent de se demander si cette barrière n'est pas altérée au fil du temps dans cette pathologie.

C'est dans le but d'améliorer les connaissances sur l'origine, la signalisation et les conséquences cognitives du syndrome d'apnée du sommeil que se place cette thèse.

En effet au cours de ces trois années de thèse nous nous sommes intéressés à deux des processus majeurs du syndrome d'apnée du sommeil : l'hypoxie intermittente, liée à la désaturation nocturne, et l'inflammation de bas grade, retrouvée dans cette pathologie. Ce sont ces différents mécanismes que nous allons développer dans les chapitres suivants, et qui ont fait l'objet de différentes communications écrites et orales au cours de ces années.

Première partie :

Étude

bibliographique

Chapitre 1 : Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil

Le Syndrome d'apnée du sommeil n'est pas une pathologie ancienne, les symptômes sont banaux avec principalement des ronflements et une fatigabilité excessive, même durant la journée. Ces symptômes n'évoquant pas de prime abord un syndrome de ce type. Le syndrome a émergé il y a déjà quelques années et est aujourd'hui l'un des problèmes majeurs en santé publique.

Le syndrome d'apnée du sommeil est une maladie respiratoire, qui peut être de type obstructive ou centrale, et qui intervient durant le sommeil. Lorsqu'il est central, ce syndrome se caractérise par un micro-arrêt du flux respiratoire durant la nuit liée à un déficit de la commande ventilatoire, sans obstruction des voies aériennes. Tandis que le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) se définit comme l'obstruction répétée de voies aériennes supérieures (pharynx) au cours du sommeil. Ces deux mécanismes conduisent à un arrêt temporaire de la respiration (1999).

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'émergence au cours des derniers siècles et des dernières décennies de cette pathologie. Nous décrirons également les connaissances actuelles en termes de mécanismes physiopathologiques associés, des risques encourus et nous évoquerons les thérapeutiques actuelles.

1. Historique

L'apnée du sommeil a été suspecté au cours du XIX^{ème} siècle mais il ne fait l'objet de travaux de recherche significatifs que depuis 50 ans (Dempsey et al., 2010). Les prémices du syndrome d'apnée du sommeil ont été mises en lumière dans les années 1800 par John Cheyne et Williams Stockes, tous deux ont décrit chez leurs sujets une respiration qui « cesserait complètement pendant un quart de minute » avant de redevenir perceptible. Et cette respiration anormale a été associée à un déficit de la commande centrale, elle sera nommée pendant des années **respiration de Cheyne-Stockes**. Par la suite Broadbent va décrire des pauses décrites comme obstructives chez les sujets souffrant d'une respiration de Cheyne-Stockes (Broadbent, 1877). Dans

la deuxième partie du XIX^{ème} siècle, on décrit le **syndrome de Pickwick** qui relie l'obésité avec une somnolence diurne importante. En effet, en 1956, Burwell et al. ont montré ce type de relation, puis en 1965, Gastaut et al. établissent le lien entre le syndrome de Pickwick et les apnées répétées au cours du sommeil grâce à la polygraphie du sommeil. Cette même équipe classifia 3 types d'apnées : l'apnée obstructive, l'apnée centrale et l'apnée complexe. C'est seulement en 1976 que Christian Guilleminault propose la terminologie connue aujourd'hui c'est-à-dire « le syndrome d'apnée obstructive du sommeil » et on sait aujourd'hui que ce syndrome est particulièrement fréquent dans la population générale (Guilleminault et al., 1976).

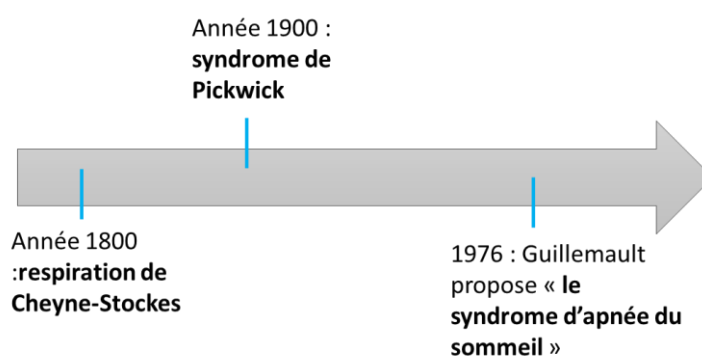


Figure 1 : Représentation schématique des étapes de la recherche sur le syndrome d'apnée du sommeil.

2. Définition et prévalence

Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est défini par deux principales manifestations cliniques, le ronflement nocturne et la somnolence diurne, en lien avec des troubles de la respiration de type apnée – hypopnée. Le SAOS est décrit comme un rétrécissement des voies aériennes supérieures (VAS) au cours du sommeil, lié à une obstruction complète (apnée) ou incomplète (hypopnée), malgré un effort respiratoire incessant (1999). L'obstruction de ces VAS est due au relâchement des muscles péri-pharyngés et entraîne un pattern respiratoire organisé et cyclique avec une diminution du débit d'air, qui se caractérise par une diminution de la pression partielle en O₂ et une augmentation de la pression partielle en CO₂. La répétition de ces obstructions provoque des micro-éveils, induisant ce sommeil dit « fragmenté ».

La gravité du SAOS est décrite par le nombre d'apnées-hypopnées par heure de sommeil représentant l'index d'apnée-hypopnée (AHI). La classification de la sévérité

se fait comme suit : si l'AHI est inférieur à 5 alors on considère que le sujet ne souffre pas de SAOS ; si l'AHI se situe entre 5 et 15 alors les sujets souffrent d'un SAOS léger ; si l'AHI se situe entre 15 et 30 alors le SAOS est considéré comme modéré et enfin quand l'AHI est supérieur à 30, cela indique un SAOS sévère (Berry et al., 2012). Le gold standard permettant d'évaluer la sévérité d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil est la polysomnographie ou la polygraphie multicanaux. Pour évaluer cet index, il est nécessaire de définir ce qu'est un événement respiratoire anormal, ces événements sont donc décrits comme tel :

- ✚ Une **hypopnée** est considérée comme la réduction de 30% au minimum du débit d'air par rapport à celui avant l'événement, que l'on mesure par pression nasale. Cette diminution dure minimum 10 secondes et doit être associée à une baisse de la saturation artérielle en oxygène de 3 % et/ou d'un micro-éveil.
- ✚ L'**apnée** est considérée comme la réduction de 90% minimum du même ratio que précédemment pendant au moins 10 secondes, accompagnée d'effort ventilatoire dans le cas d'une obstruction ou sans effort ventilatoire si l'apnée est centrale

Pour la (Société de Pneumologie de Langue Française, 2010), le diagnostic du SAOS est défini par un nombre d'événements anormaux supérieurs à 5, tandis que l'« American Academy of Sleep Medicine » définit le critère de diagnostic à un nombre d'événements anormaux supérieur à 15. Ce seuil est établi selon des données épidémiologiques, suggérant des effets de santé au-delà de ce seuil (Young et al., 1997a, 1997b). Plus l'AHI est élevé, plus les manifestations comme la somnolence diurne, les troubles neurocognitifs, et le développement de complication cardiovasculaire sont graves et/ou fréquents (Peppard et al., 2000; Young et al., 1993, 1997b).

Cette différence inter-pays rend l'évaluation comparée de sa prévalence compliquée. En effet, la prévalence du SAOS est dépendante de la gravité de celui-ci, de la présence ou non de symptôme ou encore de la population étudiée (Heinzer et al., 2015; West and Turnbull, 2018; Young et al., 1993). Cependant à l'heure actuelle, les études menées montrent que la prévalence diffère selon le sexe et l'âge, chez un adulte de 30 à 60 ans elle est de 24% chez l'homme et 9% chez la femme pour un $AHI \geq 5$

aux États-Unis (Young et al., 1993). Or sur une population similaire en Europe, la prévalence chez les adultes de 30 à 70 ans est de 26% des hommes et de 28% des femmes (Durán et al., 2001). En France peu de données existent et elles sont issues d'études transversales telles que celles issues de la cohorte PROOF. Cette cohorte représente un ensemble de sujets, d'âge homogène, dont la prévalence du SAOS est de 56% à 67 ans pour un $AHI \geq 15$ (Assoumou et al., 2012). Néanmoins les biais d'évaluation de la prévalence sont nombreux de par les différences de caractéristiques des populations, des méthodes de mesure utilisées, ainsi il resterait 93% de femmes et 82% d'hommes avec un SAOS modéré à sévère qui serait non diagnostiqué (Finkel et al., 2009; Young et al., 1993).

Dans une revue regroupant des études sur 20 années, la moyenne de la prévalence d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil avec un $AHI \geq 5$ est de 22% pour les hommes et 14% pour les femmes (Franklin and Lindberg, 2015; Franklin et al., 2013). La dernière étude récente de grande qualité et utilisant une polysomnographie ambulatoire (Hypnolaus) a évalué une population âgée entre 35 et 75 ans, et la prévalence retrouvée est de 23.4% des femmes et 49.7% des hommes (Heinzer et al., 2015).

Il est donc important de retenir que le SAOS est un syndrome avec une forte prévalence dans la population mondiale, mais que son estimation est difficile et que de ce fait un certain nombre de patients ne sont pas détectés immédiatement.

3. Facteurs de risque

De nombreux facteurs de risques de développement de cette pathologie du sommeil ont été décrits. Le premier, décrit dès les premières découvertes du SAOS dans les années 1950, est l'obésité mais on décrit également à cette époque le sexe masculin. Ces facteurs de risques sont principalement liés à la population étudiée dans ces années-là. Mais aujourd'hui des études montrent que le SAOS n'est pas rare chez les femmes et les personnes non obèses, alors qu'il est fréquent chez des personnes âgées. En effet la prévalence du SAOS augmente avec l'âge et ceci indépendamment des autres facteurs évoqués précédemment (Bixler et al., 1998; Durán et al., 2001; Heinzer et al., 2015). Outre les facteurs sexe, âge, obésité, des facteurs génétiques et anatomiques sont également impliqués dans l'augmentation du nombre de SAOS. De

plus le SAOS est associé à un risque accru de décès toutes causes confondues et indépendamment des autres facteurs de risques (Yaggi et al., 2005).

4. Traitement

Le traitement standard du syndrome d'apnée obstructive du sommeil est la pression positive continue (PPC) nocturne par l'intermédiaire d'un masque facial lié à une machine de type mini compresseur. Le but étant le maintien des voies aériennes supérieures ouvertes au cours du sommeil (Giles et al., 2006). Ce traitement est efficace pour améliorer les symptômes (Gupta et al., 2016; Iftikhar et al., 2017; Sharples et al., 2016), la qualité de vie (Bucks et al., 2013), la somnolence diurne et les troubles cognitifs. Cependant l'efficacité sur la morbidité cardiovasculaire ne semble pas être améliorée par la PPC (Yu et al., 2017). Qui plus est l'un des facteurs de réussite du traitement est la durée de celui-ci, ou l'observance, c'est-à-dire le nombre d'individus maintenant le traitement dans la durée, or celui-ci reste relativement faible. C'est d'ailleurs l'un des problèmes majeurs dans la prise en charge de cette pathologie (Sawyer et al., 2011). A l'heure actuelle d'autres traitements existent comme la perte de poids, l'arrêt de la consommation d'alcool ou de drogue, qui sont recommandés chez les personnes concernés, mais également des traitements chirurgicaux tels que les dispositifs d'avancement ou de propulsion mandibulaire.

Malgré le nombre d'alternatives possibles en termes de traitement, le plus efficace reste le traitement par PPC, or celui-ci est soumis au problème de la baisse d'observance lorsque son utilisation est chronique, c'est pourquoi il est nécessaire d'améliorer les connaissances sur les risques physiopathologiques associés, afin de mettre en place de nouvelles thérapeutiques toutes aussi efficaces mais mieux supportées par les patients.

5. Mécanismes physiologiques associés

Parmi les conséquences de l'apnée, qui sont multiples, il y a celles qui vont être en lien dit « direct » avec l'obstruction des voies aériennes durant le sommeil. Ce sont les micros-éveils et l'hypoxie intermittente chronique, qui sont associés à la chute de la saturation en oxygène et qui vont perturber les réponses hémodynamiques et les structures anatomiques (Somers et al., 1993). D'autres conséquences sont en lien dit

« indirectes », ce sont celles qui sont induites après un certain temps de latence par les mécanismes directs et qui vont persister durant la veille comme par exemple les processus inflammatoires.

Les micros-éveils, amenant à **la fragmentation du sommeil**, sont définis comme un allègement du sommeil voire un éveil, nécessaire pour reprendre la respiration. En effet dans le cadre du SAOS, le sommeil est désorganisé avec une alternance de quelques dizaines de secondes de sommeil et de quelques secondes d'éveil. Cette fragmentation peut engendrer des conséquences systémiques telles qu'une somnolence diurne excessive, qui se manifeste par des endormissements dans des situations dites passives et monotones, entraînant par exemple des accidents de la route. Mais la perturbation du cycle circadien peut également entraîner une réponse inflammatoire chez ces patients, et c'est cette part inflammatoire qui nous intéressera particulièrement (Irwin, 2002; Mullington et al., 2010).

Cependant la conséquence principale du SAOS reste néanmoins, pour de nombreux auteurs, **l'hypoxie intermittente** (HI), qui résulte de la répétition des cycles hypoxie – ré-oxygénation (Lévy et al., 2015). Ces cycles sont impliqués probablement dans la genèse des maladies cardiovasculaires, métaboliques, et cérébrovasculaires (Somers et al., 2008), par l'intermédiaire de mécanismes allant du stress oxydant à l'inflammation systémique, pouvant engendrer des dysfonctionnements métaboliques et endothéliales (Lévy et al., 2015; Somers et al., 2008). Le SAOS est connu pour être lié à une altération du fonctionnement cérébral avec des troubles cognitifs associés tels qu'une modification des capacités de vigilances ou d'attention. Il a également été observé des modifications de la mémoire visuelle et/ou verbale, et des fonctions exécutives (Bucks et al., 2013), bien que les compétences linguistiques et expressives soient préservées (Bucks et al., 2017). Néanmoins, des études montrent que la sévérité de l'hypoxémie est associée à une détérioration globale (Aloia et al., 2004), tandis que l'attention et la vigilance seraient liées à la fragmentation du sommeil (Bucks et al., 2013). Ces altérations résulteraient principalement de conséquences liées aux collapsus pharyngés, c'est-à-dire l'obstruction, et donc à une hypoxie suivie d'une réoxygénation. Mais elles seraient également en lien avec la diminution du débit sanguin cérébral et la fragmentation du sommeil (Rosenzweig et al., 2015). Ces événements délétères tels que la chronicité de l'hypoxie intermittente pourraient

entraîner une altération structurelle de diverses régions cérébrales, notamment une modification de la substance grise cérébrale et l'hypertrophie de certaines régions telles que les régions préfrontale, l'hippocampe et cérébelleuse (Goldbart et al., 2003; Rosenzweig et al., 2015). Mais une hypothèse plus récente fait l'objet d'études au sein du Laboratoire. Cette hypothèse consiste à corréliser les modifications cognitives avec l'altération d'une structure spécifique du cerveau: la barrière hémato-encéphalique, avec des possibles modifications synaptiques, ce qui a fait l'objet d'une revue d'hypothèse par Lim and Pack en 2014 (Lim and Pack, 2014).

5.1 L'hypoxie et l'hypoxie intermittente chronique

Comme décrit précédemment le SAOS peut induire une hypoxie intermittente sévère au cours du sommeil, et les données cliniques suggèrent un lien entre ces épisodes respiratoires répétées et la morbidité neurocognitive ces dernières années (Zhang et al., 2012), avec des mécanismes d'adaptation et d'induction de lésions cérébrales. De manière générale, l'hypoxie est un stimulus qui peut modifier l'homéostasie cellulaire cérébrale (Keller, 2013), elle impacte également le développement et contribue à la progression de nombreuses pathologies comme le SAOS (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012).

En effet, le système nerveux central (SNC) est un très grand consommateur d'oxygène, et avec une consommation au repos de 20% de l'oxygène du débit cardiaque, cela fait de l'oxygène, la principale source d'énergie cérébrale (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). De ce fait, toute modification du taux d'oxygène entraîne d'importantes modifications de l'homéostasie du SNC et par conséquent implique des possibles conséquences sur le cerveau. La survie tissulaire va dépendre de la capacité des cellules, qui composent les différents tissus et/ou organes, à adapter leurs métabolismes. En effet, au cours de l'hypoxie, les cellules vont devoir passer d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie. Or les voies de signalisations impliquées dans le métabolisme à l'oxygène sont nombreuses. Cependant la voie la plus décrite et qui est à l'heure d'aujourd'hui considérée comme la principale voie liée à l'hypoxie, implique la libération d'un facteur de transcription: HIF (hypoxia inducible factor) (Engelhardt et al., 2014; Fandrey and Gassmann, 2009). HIF est une famille de médiateurs hypoxiques dont le plus largement décrit, de par son rôle majeur

dans l'induction et la régulation de l'hypoxie est HIF-1 (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012).

HIF-1 est un facteur transcriptionnel à 2 sous-unités: la sous unité α (HIF-1 α : 120kDa), qui est sensible à l'oxygène de par la présence de son domaine ODD (Oxygen Dependant Degradation) et la sous-unité β , autrement connu sous le nom de l'ARNT (Aryl Hydrocarbon Nuclease Translocator), qui n'est pas sensible à l'oxygène. HIF-1 α est localisé dans le cytosol, tandis que la sous-unité β se retrouve dans le noyau, toutes deux exprimées de manière constitutives (Semenza, 2002). Les gènes cibles de cette voie hypoxique sont multiples, avec une implication sur la glycolyse via le transporteur du glucose GLUT-1, de l'angiogenèse avec le facteur de croissance Vascular Endothelial Growth Factor ou VEGF mais également des réponses tissulaires très variées comme implication de la carbonic anhydrase 9 et la régulation du pH (Hofer et al., 2002; Maxwell and Ratcliffe, 2002).

Dans le cas de la **NORMOXIE**, le médiateur HIF-1 α est situé dans le cytosol et va être dégradé par une enzyme : la ProlylHydroxylase Domains (PHDs) (Berra et al., 2003; Jaakkola et al., 2001). La PHD utilise l'oxygène comme substrat, et comme son nom l'indique la PHD va venir hydrolyser les résidus proline situés au niveau du domaine ODD de la sous unité α de HIF-1. Cela va permettre le recrutement de la protéine de suppression de tumeur de Van Hippel Lindau (VHL) (Maxwell et al., 1999), et de poly-ubiquitiner la sous-unité α afin qu'elle puisse être pris en charge par le protéasome et dégradée par la ligase E3 (Kallio et al., 1999; Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). La demi-vie de HIF-1 α est inférieure à 5 minutes en normoxie (Salceda and Caro, 1997).

Lorsque les cellules cérébrales détectent une diminution de la pression partielle, c'est-à-dire une **HYPOXIE**, l'enzyme PHD est inhibée (Engelhardt et al., 2014), la phosphorylation du résidu proline de HIF-1 α ne peut plus se faire et la sous-unité HIF-1 α échappe alors à la dégradation par le complexe VHL-E3 ubiquitine-ligase protéasome. La sous-unité HIF-1 α est alors libre dans le cytoplasme, elle va pouvoir être transloquée dans le noyau grâce à une protéine chaperonne Hsp90 (Minet et al., 1999). Le noyau étant le lieu de localisation de HIF-1 β . Lorsque la sous unité HIF-

1 α et HIF-1 β se retrouvent dans le noyau, un hétérodimère va se former, créant ainsi un complexe protéique fonctionnel qui se fixe sur les promoteurs des gènes cibles. Cette liaison se fait entre le complexe protéique et la séquence consensus 5'- (A/G)CGTG-3' du gène cible, une HRE (hypoxia response element) (Wang and Semenza, 1993; Xia and Kung, 2009).

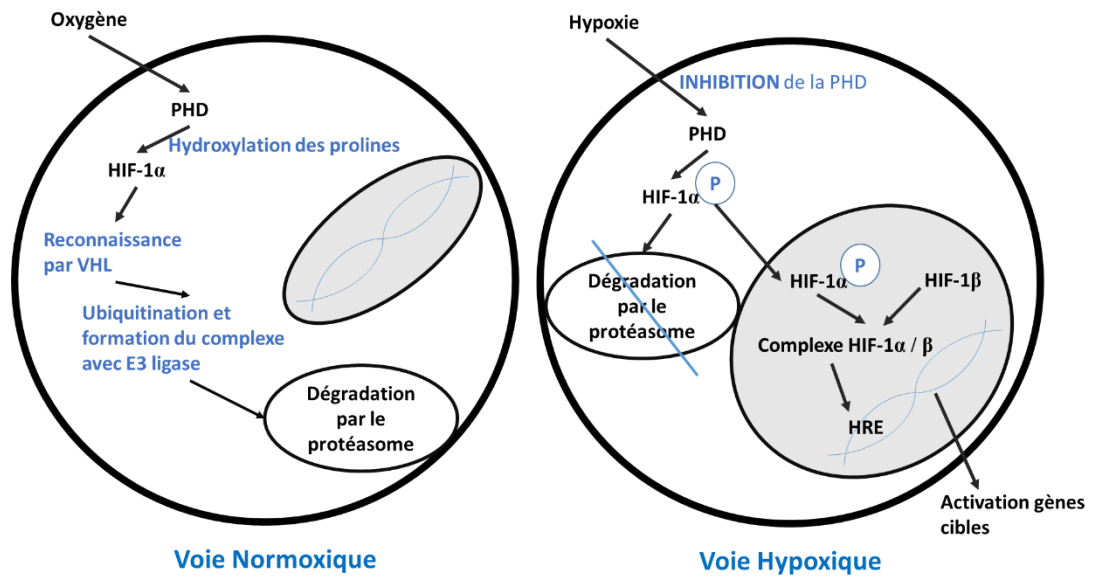


Figure 2 : Illustration schématique de la voie HIF-1 que ce soit en normoxie ou en hypoxie. En condition normoxie, grâce à la détection d'oxygène l'enzyme PHD va venir hydroxyler la sous-unité α , ce qui va conduire à la formation d'un complexe HIF-1 α -VHL-E3 qui sera dégradé par le protéasome. En absence d'oxygène (hypoxie) la PHD ne joue plus son rôle il y a donc pénétration de la sous-unité α dans le noyau, où elle formera un complexe avec HIF-1 β . Ce complexe va activer des éléments de réponses HRE qui vont alors activer les gènes cibles.

Cette voie HIF-1 est la principale voie activée lorsque les chémorécepteurs détectent une diminution de la pression partielle en oxygène. Ainsi en activant cette voie hypoxique, le système déclenche l'activation d'autres voies de signalisations, qui joueront elles aussi un rôle dans les déséquilibres cérébraux et cardiaques observés chez des sujets souffrant d'un SAOS. L'une des voies activées par l'intermédiaire de la voie hypoxique est la voie inflammatoire.

5.2 L'inflammation

L'inflammation est une réponse protectrice locale des suites d'une lésion ou d'une invasion par un pathogène étranger. Dans sa revue, Tracey (Tracey, 2002) montre une régulation réflexe de la réponse inflammatoire, c'est-à-dire une réponse en temps réel, similaire à la régulation réflexe qui contrôle les fonctions vitales. Le SAOS est caractérisé par une hypoxie intermittente chronique avec des efforts respiratoires ainsi qu'une altération de l'architecture du sommeil, entraînant une dysautonomie qui pourrait influencer la progression d'un état inflammatoire chronique, de faible intensité mais persistant chez des patients SAOS (Kheirandish-Gozal and Gozal, 2019). Avec une hétérogénéité des biomarqueurs impliqués liée à l'environnement et à l'influence génétique. Ainsi, l'augmentation des marqueurs inflammatoires sanguins représente une morbidité silencieuse (Kheirandish-Gozal et al., 2019; Nadeem et al., 2013). Il a été montré une association positive entre une hypoxie intermittente chronique et la libération de facteurs inflammatoires tels que les protéines C-réactives de haute sensibilité (CRP) ou encore les cytokines proinflammatoires tels que l'interleukine -6 -8 et le Tumor necrosis factor (TNF- α) (Ohga et al., 2003; Tam et al., 2007). Mais cette association avec les médiateurs de l'inflammation se retrouve également lors d'une dette de sommeil aiguë ou chronique (Meier-Ewert et al., 2004). De plus le prélèvement de cellules monocytaires de patients atteints d'un SAOS, ont montré une capacité de production de CRP et d'interleukine-6 (IL-6) plus importante (Yokoe et al., 2003) et des études tendent à montrer que la sévérité du SAOS est proportionnelle aux taux sérique de CRP, indépendamment du surpoids (Punjabi and Beamer, 2007; Shamsuzzaman et al., 2002). A noter également que les possibles lésions cérébrales associées aux collapsus des voies aériennes supérieures sont promues par l'hypoxie intermittente, et conduiraient à une inflammation tissulaire associée aux mouvements d'eau (Tauman et al., 2004). Cependant l'influence cytokinique propre au SAOS reste controversée et certaines études envisagent que la libération des médiateurs inflammatoires soit associée aux pathologies liées telles que les infarctus, ou encore le diabète et non au SAOS lui-même. C'est cette inflammation due aux pathologies associées qui impliquerait une mortalité augmentée dans le SAOS, indépendante de la sévérité de ce dernier.

De manière générale lors d'une réponse inflammatoire, les premiers médiateurs inflammatoires secrétés sont les médiateurs proinflammatoires dont fait partie le TNF- α et l'interleukine-6. Tous deux ont été largement décrits comme impliqués dans le SAOS (Nadeem et al., 2013).

5.2.1 Tumor Necrosis Factor (TNF- α)

Le TNF- α est une cytokine proinflammatoire de la phase systémique de l'inflammation : c'est l'une des plus puissantes et des plus décrites. Elle appartient à la superfamille des ligands du TNF- α , avec une implication dans la promotion de la signalisation inflammatoire (Shen and Pervaiz, 2006; Wallach et al., 1999). Initialement découvert pour ses effets sur la viabilité tumorale *in vivo* (Carswell et al., 1975), on lui donne alors le nom de « facteur nécrotique de tumeur ». Par la suite, il fut décrit dans d'autres systèmes cellulaires et moléculaires. Le TNF- α est exprimé de manière constitutive dans l'organisme, sous sa forme transmembranaire (tTNF- α : 26kDa). Sous cette forme, il est inactif. Afin d'être activé, son domaine extracellulaire doit être clivé donnant ainsi la forme soluble (sTNF- α : 17kDa) (Black et al., 1997). La formation de la forme active va être régulée par l'enzyme de conversion du TNF- α (TACE). La TACE est une métalloprotéinase de la matrice, ce qui facilite le clivage du tTNF- α . Une fois clivée, la forme soluble est libre de circuler et d'avoir une action autocrine ou paracrine. Le rôle du TNF- α est varié. Il joue un rôle dans la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire ou encore dans la transcription génétique (Grilli et al., 1993; Murphy et al., 1988). Le TNF- α est capable de sélectionner son action : son action pléiotropique est médiée par 2 récepteurs, de type 1 (TNFR1) et de type 2 (TNFR2). Leur expression, leur structure, et la voie de signalisation en aval sont différentes, bien qu'il y ait quelques similitudes dans les mécanismes déclenchés (Aggarwal, 2003, 2003), ce qui permet à chacun d'activer ses propres réactions (Hsu et al., 1995, 1996).

Le récepteur TNFR1 est exprimé dans différents types cellulaires. Il est activé par sa liaison avec le TNF- α soluble, même s'il n'est pas incompatible avec la forme transmembranaire. De manière générale le TNFR1 se lie à plus de protéines grâce à son domaine intracellulaire et permet d'activer un plus grand choix de voies de signalisations par rapport au TNFR2. Quand TNFR1 se lie au sTNF- α , un ensemble de réactions complexes se produisent menant entre autres à l'activation de la voie

NFκB, induisant la prolifération cellulaire, la production d'autres cytokines ou encore en déclenchant des voies de signalisations dites "pro-survie", comme par exemple la voie JNK, ou des voies d'apoptoses dépendantes de caspases, telles que la caspase 8 (Tobiume et al., 2001).

Le récepteur TNFR2 est quant à lui limité à une localisation endothéliale, neurale, hématopoïétique et au niveau de certaines cellules immunitaires. Il partage certaines réponses de type pro-survie et inflammatoire avec le TNFR1 mais sa voie de signalisation passe par le recrutement de protéines qui activeront le NFκB (Rothe et al., 1995). Le récepteur TNFR2 ne peut pas induire d'apoptose car il ne possède pas de caspase, et la plupart du temps, son activation est considérée comme favorable à la survie cellulaire. Contrairement à son homologue, le TNFR2 se lie préférentiellement avec la forme transmembranaire du TNF-α, ce qui a un impact biologique plus faible (Grell et al., 1995). Sa principale contribution serait plutôt d'être un intermédiaire de ligand pour le TNFR1.

Le rôle du TNF-α peut-être double, avec une influence protectrice ou néfaste, la localisation et l'expression des récepteurs, associées à un état d'activation cellulaire peut avoir un rôle cumulatif (Akassoglou et al., 2003; Dopp et al., 1997; Fontaine et al., 2002). Les voies Nuclear Factor κ B (NFκB), et c-Jun N-terminal Kinase (JNK) ne seraient qu'une partie des voies activées par le TNF-α, influençant les processus physiologiques clés tels que l'inflammation, la prolifération, l'apoptose ou la nécrose cellulaire (Eissner et al., 2004; Ware, 2005).

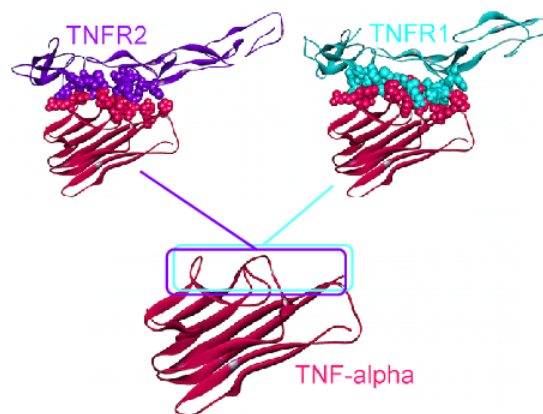


Figure 3 : représentation de la structure du TNF- α et des ces 2 principaux récepteurs le TNFR1 et TNFR2 d'après Maiorov et al. (Guvén-Maiorov et al., 2014)

5.2.2 L'interleukine -6

L'interleukine 6 (IL-6) est une glycoprotéine de la famille des gp130 (20-30 kDa), elle a un effet pléiotrope et joue un rôle de défense de l'hôte (Akira et al., 1993). Initialement découverte dans les lymphocytes notamment dans la différenciation des cellules B naïves en anticorps (Hirano et al., 1985). On sait maintenant que sa production peut se faire par de nombreux types cellulaires tels que les monocytes, les ostéoblastes, les lymphocytes T et B et les cellules endothéliales (Akira et al., 1993), jouant ainsi un rôle important dans de nombreux systèmes que ce soit nerveux, cardiovasculaires ou endocriniens.

Afin de jouer pleinement son rôle, l'IL-6 doit se lier à son récepteur (IL-6R), que l'on trouve sous deux formes : transmembranaire (tIL-6R : 80kDa) et soluble (sIL-6R) (Kishimoto et al., 1992). C'est seulement suite à la formation d'un complexe IL-6 / tIL-6R / sIL-6R, que la cytokine va pouvoir s'associer à la glycoprotéine 130 (gp130) (Kishimoto et al., 1992). Une fois lié entre eux, ils forment une structure hexamérique (Boulangier et al., 2003), qui va permettre la transduction du signal et l'activation des voies de signalisations (Heinrich et al., 2003). La présence de la forme soluble de l'IL-6R est une caractéristique unique dans la famille des gp130. En effet l'IL-6R soluble pourrait induire une signalisation chez les cellules porteuses de gp130. Et il semble y avoir un effet agoniste aux cellules porteuses de IL-6R transmembranaires permettant une signalisation de la protéine gp130 (Jones et al.,

2011; Rose-John et al., 2006). La voie principale induite par l'IL-6 serait la voie JAK/STAT (Janus Kinase / Signal transduction and activator of transcription), une liaison permettant d'activer les tyrosines kinases en induisant la phosphorylation de la queue cytoplasmique de la protéine gp130. Ce mécanisme permet de découvrir des points d'ancrage pour STAT. Cette interaction est le signal d'autorisation de la dimérisation et ainsi de sa translocation dans le noyau où ils régulent les gènes cibles (Darnell et al., 1994). L'IL-6 peut également activer d'autres voies de types MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase), Pi3/Akt, NFkB (Heinrich et al., 2003).

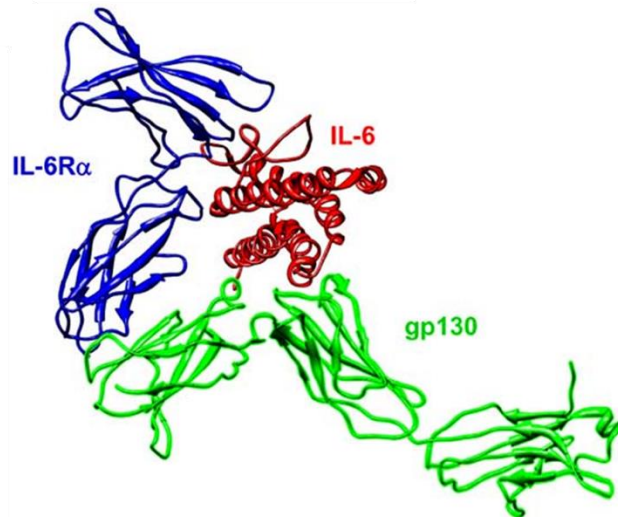


Figure 4 : Représentation de la structure du complexe IL-6 / IL-6R / gp130, nécessaire à la transduction du signal d'après Abeywardena et al. (Abeywardena et al., 2009)

5.2.3 L'interleukine -17

Le TNF- α , et l'IL-6 ont un rôle reconnu dans la réponse inflammatoire. Cependant dans leurs travaux Jin Ye et al. expliquent que la régulation de l'inflammation chronique dans le SAOS se fait par l'intermédiaire de lymphocyte T, tel que le LTh17 qui est responsable de la sécrétion de l'IL-17 et de l'IL-6 (Ye et al., 2012). De plus, des études portant sur l'inflammation chez des patients atteints d'un SAOS de forme pédiatrique révèle des taux anormaux de l'interleukine-17 (Huang et al., 2016). C'est

ce qui nous a amené à nous intéresser à cette cytokine en plus de celles habituellement étudiées dans le cadre du SAOS.

L'IL-17 est une cytokine proinflammatoire, libérée par les lymphocytes T « Helper » 17, LTh17. Les LTh jouent un rôle critique dans l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire via la sécrétion de cytokines spécifiques. Le recrutement des LTh17 se fait lors d'une réaction à des pathogènes extracellulaires, des champignons, Le LTh17 répond en produisant de l'interleukine 17, entraînant alors une réponse protectrice rapide (Park et al., 2005). Les LTh17 sont principalement une population proinflammatoire et la sur-activation de cette population est liée à des processus physiopathologiques auto-immuns (Maddur et al., 2012; Miossec et al., 2009). Chez l'homme, la combinaison de l'IL-6 et l'IL-1 β (Acosta-Rodriguez et al., 2007) ou encore de l'IL-6 et l'IL-23 (Wilson et al., 2007) peut entraîner la production d'IL-17 par le LTh17.

L'IL-17 appartient à la famille des interleukines 17. Cette famille possède 6 membres de l'IL-17A à l'IL-17F. L'IL-17A est plus connue sous le nom de l'IL-17, elle est similaire génétiquement à l'IL-17F. IL-17 A et F possèdent donc des similitudes dans leurs fonctions biologiques mais avec une prédominance d'activité de l'IL-17A. Elle agit grâce à 2 récepteurs, l'IL-17RA et l'IL-17RC (Noack and Miossec, 2014). Ces deux récepteurs ont une distribution ubiquitaire, ce qui permet à l'IL-17A d'avoir une grande variété de cellules cibles telles que les cellules endothéliales. L'IL17 joue un rôle important dans l'immunité mais un excès de production d'IL-17 est associé à la progression de maladie auto-immune et le maintien de l'inflammation chronique (Miossec and Kolls, 2012). L'interleukine 17 joue un rôle d'intermédiaire dans la communication entre les cellules immunitaires et les tissus, c'est donc un médiateur de l'inflammation qui entraîne notamment la production de chimiokines et cytokines proinflammatoires par diverses cellules (cellules endothéliales, cellules dendritiques, ...). Ceci favorise le maintien de l'inflammation. L'IL-17 joue donc un rôle majeur dans le maintien et la chronicité de l'inflammation (Benedetti and Miossec, 2014; Fossiez et al., 1996; Miossec et al., 2009).

6. Etudes cliniques associées: cohorte PROOF

Nous venons de voir que le SAOS entraîne l'activation de nombreuses voies de signalisations cellulaires, chacune libérant des marqueurs qui lui sont spécifiques. L'ensemble des marqueurs sécrétés au cours de ces diverses activations vont se retrouver libérés dans la circulation sanguine. Ceci permet de faire l'hypothèse que les patients atteints d'un SAOS aient une « composition » en biomarqueurs aux niveaux sériques, qui leur est spécifique.

Ces divergences sériques qualitatives et quantitatives en biomarqueurs ont en effet été démontrées dans la littérature, que ce soit en termes de présence de médiateurs inflammatoires, mais également d'autres molécules connues pour être libérées dans les pathologies associées au SAOS (Jullian-Desayes et al., 2016).

C'est dans ce cadre qu'a été constituée à Saint-Étienne en 2001, une cohorte, la cohorte PROOF, qui regroupe des sujets en bonne santé, âgés de plus de 65 ans, et soucieux de contribuer à la recherche biomédicale. Cette population a bénéficié d'un certain nombre de tests paracliniques, allant de la polygraphie jusqu'au prélèvement biologique en passant par l'imagerie à résonance magnétique (IRM) cérébrale. Toutes les méthodes et le suivi de cette étude ont été décrits dans des publications du laboratoire (Barthélémy et al., 2007; Sforza et al., 2010). Grâce à ces évaluations, répétées, nous avons pu sélectionner des patients ayant un syndrome d'apnée obstructif du sommeil sévère, c'est-à-dire avec un AHI ≥ 30 mais également des sujets dits « contrôles », qui n'ont pas de syndrome d'apnée du sommeil obstructif, avec un AHI ≤ 5 . De plus, ces patients ne présentaient pas d'autres troubles neurologiques, cardiovasculaires ou métaboliques connues. Ces prélèvements biologiques nous ont permis de réaliser l'une de nos études, qui porte sur l'influence des biomarqueurs sériques sur un modèle de barrière hémato-encéphalique, structure connue pour son rôle protecteur du système nerveux central, décrite dans le chapitre 2.

Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil devient aujourd'hui, un problème de santé majeur. Ces comorbidités cardiovasculaires et cérébrovasculaires ont été largement décrites, mais on peine aujourd'hui à comprendre les mécanismes sous-jacents impliqués dans les risques observés. Des hypothèses émergent sur les

mécanismes cellulaires et moléculaires délétères associés à ce SAOS, pouvant passer par la voie HIF-1 ou encore les voies inflammatoires.

Les symptômes du SAOS, associés aux lésions cérébrales semblent être en cause dans l'augmentation de la morbidité et de la mortalité liées au SAOS, mais également dans la diminution de la qualité de vie de ces patients. Cependant, les processus physiologiques en lien avec les dommages cérébraux sont encore peu clairs. L'une des hypothèses émises récemment pour expliquer les déficits cognitifs serait une altération fonctionnelle de la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette altération serait provoquée par la libération de composés neurotoxiques dans la circulation sanguine, consécutive à des expositions à des hypoxies intermittentes répétées (Lim and Pack, 2014). Les modifications de la fonction de la barrière hématoencéphalique pourraient induire ou au moins exacerber les lésions cérébrales associées au SAOS. Dans ce sens Palomares et al. ont montré une diminution des échanges en eau à travers la BHE chez les patients SAOS comparés aux sujets contrôles, avec une diminution du coefficient : K_w suggérant une modification de la fonction de la BHE. Le K_w reflète en effet les échanges d'eau à travers la BHE, en prenant en compte la surface de perméabilité à l'eau et le volume de distribution dans le capillaire (Palomares et al., 2015). D'autres études évoquent une modification des volumes de certaines régions cérébrales, associant les modifications volumétriques à la dérégulation de la BHE (Kheirandish-Gozal et al., 2018; Macey et al., 2018).

Ainsi, un faisceau de preuves émerge sur l'importance de la barrière hématoencéphalique comme explication des déficits neurologiques observés dans le SAOS. C'est pourquoi dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons à la structure anatomique et fonctionnelle de cette barrière, mais également à la nécessité de créer des modèles cellulaires *in vitro* afin de mieux comprendre les conséquences des mécanismes impliqués dans de nombreuses pathologies. Ces modèles sont des modèles simplistes et reproductibles, qui vont permettre l'amélioration des connaissances de cette BHE et de ses modifications.

Chapitre 2 : L'unité neurovasculaire (ou NVU)

L'unité neurovasculaire est une structure cérébrale majeure. En effet, le cerveau représente le centre de contrôle du corps humain, il forme avec la corde spinale, le système nerveux central (SNC). Le SNC est responsable de l'intégralité des fonctions du corps, notamment des régulations végétatives, motrices et sensorielles, des adaptations nécessaires à l'activité tissulaire, ... (Abbott and Friedman, 2012). C'est aussi le système le plus sensible de notre organisme. Le fonctionnement du SNC est intrinsèquement lié au contrôle du milieu extracellulaire cérébral, dont les demandes métaboliques sont nombreuses. En effet, le SNC consomme à lui seul 20% de l'oxygène circulant. Pour subvenir à ses besoins, on retrouve entre le SNC et la circulation sanguine des interfaces qui possèdent des mécanismes de transport. Pour maintenir l'homéostasie cérébrale, le SNC sélectionne les nutriments importants et restreint le passage des déchets et composés étrangers, qui sont potentiellement neurotoxiques, qui s'introduisent dans le système suite aux réactions métaboliques (Ronaldson and Davis, 2015). Pour travailler efficacement, il est nécessaire que le SNC soit stable et régulé, et pour cela, il fait intervenir des structures spécifiques : les barrières biologiques.

Au niveau du cerveau et de la corde spinale ont été découvertes 3 barrières (Choi and Kim, 2008), importantes pour la régulation des échanges :

- ✚ L'épithélium du plexus choroïde, qui sépare le compartiment sanguin et le liquide céphalorachidien au niveau de ce plexus, que l'on nomme **Barrière hémato-liquidienne**.
- ✚ L'épithélium, qui sépare le liquide céphalorachidien et le parenchyme nerveux au niveau de la pie mère, que l'on nomme **Barrière liquido-tissulaire**. Cette barrière est perméable mais non sélective.
- ✚ L'endothélium des micro-vaisseaux, qui sépare le compartiment sanguin et le cerveau au niveau des micro-vaisseaux cérébraux, que l'on nomme **Barrière hémato-encéphalique**. C'est une barrière perméable, grâce à des systèmes de transports spécifiques.

Chacune de ces 3 barrières exprime des jonctions serrées, ce qui lui permet de réduire significativement le passage des ions, et des petites molécules à travers l'espace intercellulaire.

Dans ce contexte, c'est l'endothélium des capillaires cérébraux, qui permet le trafic le plus dynamique et le plus sélectif des composés (Kimelberg, 2004). De plus, on trouve au niveau de cette endothélium une diversité importante de transporteurs, impliqués dans l'influx des nutriments, vitamines,... et l'efflux des déchets, xénobiotiques,... qui se retrouvent à proximité de cette barrière hémato-encéphalique (BHE). Ces influx et/ou efflux se font notamment grâce à un système de vésicules de transcytose (Candela et al., 2010; Cecchelli et al., 2007; Tucker et al., 2012), via des systèmes enzymatiques, mais également grâce aux propriétés paracellulaires de la BHE (Dutheil et al., 2008).

La barrière hématoencéphalique est présente dans toutes les régions du cerveau, à l'exception des organes circumventriculaires (Ballabh et al., 2004). Elle est estimée à une surface totale de 21.6m² pour un cerveau humain de 1200g, elle représente la structure principale de protection du SNC (Pardridge, 2003). Les propriétés de l'endothélium de la BHE sont les premières impliquées dans la régulation « restrictive » de l'unité neurovasculaire, mais elles sont sous le contrôle des autres membres « cellulaires » de cette unité, tels que les péricytes et les astrocytes, qui jouent leurs rôles dans l'induction, le maintien et la régulation de la barrière. Dans les paragraphes suivants, nous décrirons cette unité neurovasculaire, sa structure, ses mécanismes de restrictions et les interactions intercellulaires de cette unité multicellulaire.

1. Historique

Historiquement c'est en 1885, que Paul Ehrlich découvre qu'en injectant un colorant hydrosoluble dans le système circulatoire, celui-ci colorait tous les organes à l'exception du cerveau et de la corde spinale (Ehrlich, 1885). Il attribua ses observations à une faible affinité du tissu nerveux pour le colorant. Goldmann poursuivit les travaux en injectant du bleu Trypan directement dans le liquide cébrospinal, montrant alors que les cellules du cerveau étaient colorées alors que les

cellules périphériques ne l'étaient pas. Le colorant n'ayant pas pu pénétrer vers la périphérie. Leurs démonstrations suggéraient alors l'existence d'une structure limitant le passage du colorant entre la périphérie et le SNC (Goldmann, 1913).

En 1967, l'équipe de Reese, confirma les résultats obtenus par microscopie électronique, et décrit la présence d'une barrière cellulaire, composée de cellules endothéliales cérébrales qui tapissent le système vasculaire (Reese and Karnovsky, 1967). Le premier à utiliser le terme de barrière hémato-encéphalique fut Lewandowsky dans les années 1900 (Hawkins and Davis, 2005; Lewandowski, 1900). Cette dénomination était à l'origine limitée aux cellules endothéliales cérébrales, mais actuellement le terme de BHE définit une unité multicellulaire : les unités neurovasculaires multicellulaires (NVU) (Ogunshola, 2011).

Aujourd'hui la BHE est une unité multicellulaires, composée de cellules endothéliales, d'astrocytes, de péricytes, de cellules de la microglie et des neurones (Wilhelm et al., 2011). Le support anatomique de la BHE est le système de capillaires cérébraux, ces capillaires sont composés d'une monocouche de cellules endothéliales qui reposent sur une membrane basale, où les péricytes s'enchevêtrent. Une enveloppe de pieds astrocytaires les entourent, mettant en évidence un chevauchement étroit entre les péricytes et les astrocytes autour de ces capillaires cérébraux (Mathiisen et al., 2010). Ces astrocytes sont également étroitement liés aux neurones et à la microglie (Hawkins and Davis, 2005).

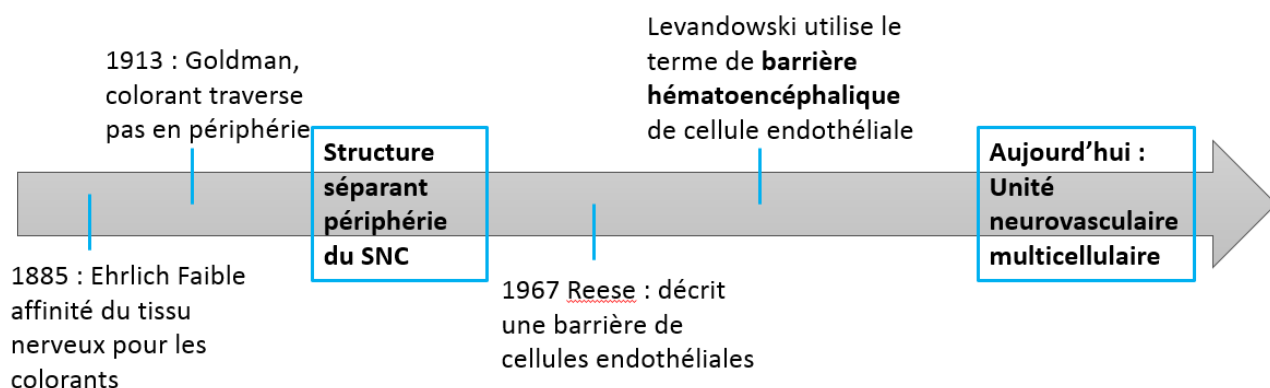


Figure 5 : Représentation schématique des étapes de la recherche ayant menées à la structuration sous forme d'unité neurovasculaire

2. L'Endothélium cérébral microvasculaire

La base anatomique de la BHE est donc le capillaire cérébral, composé des cellules endothéliales micro-vasculaires cérébrales. Ces cellules possèdent des caractéristiques qui les différencient des autres endothéliums périphériques, telles que l'absence de fenestration (Ballabh et al., 2004). Ces cellules sont polarisées et connectées entre elles par un système de jonctions intercellulaires spécifiques, ce qui permet de limiter les mouvements moléculaires et ioniques entre les cellules, c'est-à-dire les mouvements paracellulaires (Daneman, 2012). De plus, ces cellules sont riches en mitochondries, le nombre important de mitochondries étant lié aux besoins énergétiques plus intense au niveau des cellules endothéliales cérébrales, principalement pour maintenir les caractéristiques structurales et les activités métaboliques, telles que le transport des nutriments (Persidsky et al., 2006). Enfin, la faible quantité en vésicules d'endocytose et de pinocytose (Sedlakova et al., 1999), c'est-à-dire des vésicules d'invagination de la membrane cellulaire qui permet le transport de substances, confirme la propriété de restriction des échanges entre la circulation sanguine et le compartiment cérébral.

Cependant ces caractéristiques spécifiques aux capillaires cérébraux sont déterminées par l'environnement cellulaire et moléculaire tel que les péricytes et les astrocytes, qui jouent un rôle essentiel dans les communications intercellulaires dans l'UNV.

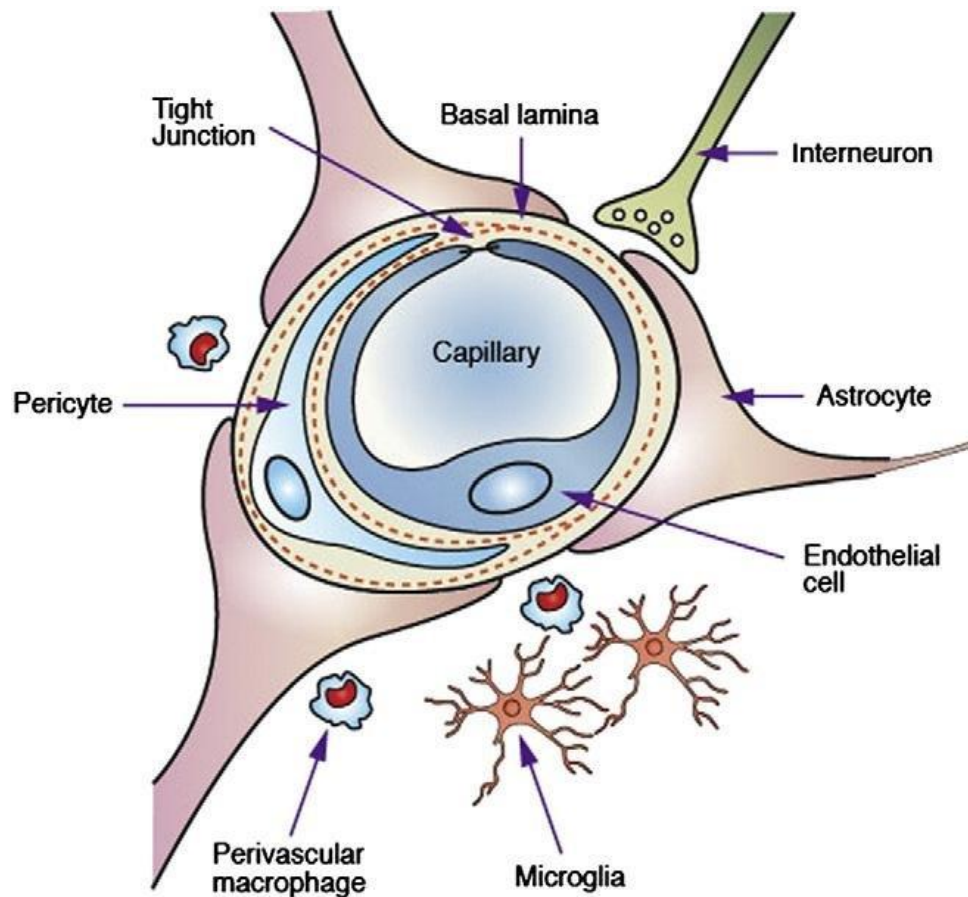


Figure 6 : Structure de l'unité neurovasculaire multicellulaires d'après Parashar et al (Parashar et al., 2012). On observe les cellules endothéliales formant le capillaire, étroitement liées aux péricytes, astrocytes et autres cellules périphériques associées.

2.1 La restriction paracellulaire

Le trafic moléculaire à travers la barrière peut se faire par deux voies distinctes :

- ✚ La voie paracellulaire
- ✚ La voie transcellulaire

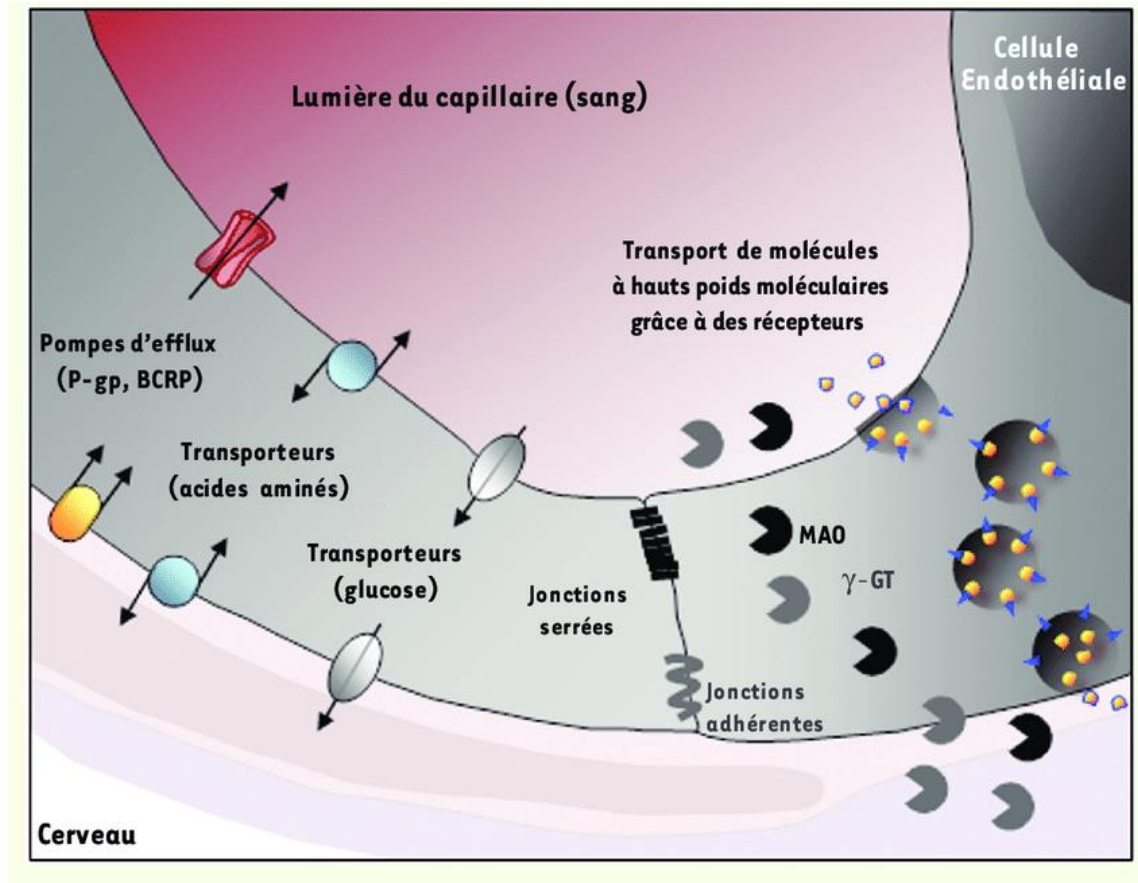


Figure 7 : Représentation des différents systèmes de transport à travers l'endothélium cérébral de la BHE d'après Gosselet et al. (Gosselet et al., 2011). On peut observer les jonctions serrées et les jonctions adhérentes entre deux cellules endothéliales, qui permettent de restreindre la voie paracellulaire. On note également des systèmes de transport d'efflux et de transport vésiculaire qui régulent la voie transcellulaire de cette BHE.

Les mouvements des molécules biologiques par le biais des jonctions interendothéliales constituent le passage paracellulaire. Dans ce cas les propriétés restrictives de la barrière sont liées à la présence de jonctions spécifiques, présentes au niveau des cellules endothéliales. Elles leur permettent ainsi de s'associer les unes avec les autres afin de former la monocouche cellulaire des capillaires cérébraux (Dejana and Del Maschio, 1995; Dejana et al., 2000). Cette voie paracellulaire est limitée grâce à la présence de complexes protéiques, formant des jonctions et interagissant avec le cytosquelette de l'endothélium cérébral. La régulation de ces complexes protéiques se fait par ouverture et / ou réarrangement architectural de ces composants (Bazzoni and Dejana, 2004). Les interactions dynamiques entre les complexes protéiques et les protéines intracellulaires est fondamental pour la

régulation des échanges entre le compartiment sanguin et le compartiment cérébral (Garcia et al., 1995). Ce trafic à travers la voie paracellulaire est exclusivement passif, mais d'autres composés peuvent également diffuser à travers la membrane par exemple, l'oxygène et le dioxyde de carbone, qui diffusent librement. Le trafic paracellulaire est peu sélectif et est dirigé par des gradients osmotiques, et électrochimiques (Bazzoni, 2006). Les complexes protéiques de cette voie paracellulaire constituent des jonctions de différents types, tels que les jonctions adhérentes, les jonctions serrées, toutes deux augmentent l'étanchéité de l'endothélium cérébral, ou encore des jonctions communicantes, qui servent d'intermédiaire à la communication intercellulaire (Hawkins and Davis, 2005).

2.1.1 Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont celles qui confèrent à la barrière les propriétés d'étanchéité paracellulaire, qui permet le maintien de la polarisation associée à une importante résistance électrique transendothéliale (TEER) (Bazzoni, 2006; Hawkins and Davis, 2005). Les jonctions serrées sont des complexes multi-protéiques, qui sont maintenus par le microenvironnement cérébral tels que les astrocytes (Ronaldson and Davis, 2015). Elles permettent également la communication/signalisation intercellulaire et l'adhésion intercellulaire (Luissint et al., 2012). Les jonctions serrées influencent la perméabilité paracellulaire et le maintien de la polarité cellulaire, en répartissant de manière asymétrique les constituants membranaires de part et d'autre de cette membrane (Bazzoni and Dejana, 2004; Hawkins and Davis, 2005). Les contacts étroits formés par les protéines de jonctions serrées entre les cellules, permettent la régulation de l'homéostasie cérébrale, notamment en limitant l'accès aux substances présentes dans la circulation sanguine et/ou aux cellules environnantes par cette voie paracellulaire. Au niveau de cette barrière, seules les petites molécules, ainsi que les molécules de nature lipidique (de par leur capacité à être liposoluble dans la membrane plasmique), peuvent traverser vers le compartiment cérébral soit par diffusion à travers la membrane, soit à travers la voie paracellulaire (Ogunshola, 2011). La restriction du passage des ions inorganiques grâce aux jonctions serrées peut être représentée par une résistance électrique transendothéliale élevée au niveau de la BHE. De plus, ces jonctions serrées forment un réseau protéique dynamique, localisé à la surface apicale des cellules endothéliales cérébrales (Dyrna et al., 2013). Ce réseau est

principalement composé de 2 types de protéines transmembranaires : les **claudines** et l'**occludine**, qui se lie aux cytosquelettes d'actine par l'intermédiaire de protéines cytoplasmiques : les **zonulas occludens**, ce qui va permettre de stabiliser les jonctions (via les contacts inter-protéiques) et donc d'avoir une monocouche endothéliale solide (Bauer and Traweger, 2016). Les interactions entre les différentes protéines, qui permettent la formation d'un complexe de jonction, sont essentielles à la protection du SNC et ont fait l'objet de nombreuses revues dont celle de Abbott en 2010 (Abbott et al., 2010) ou encore Bauer en 2016 (Bauer and Traweger, 2016).

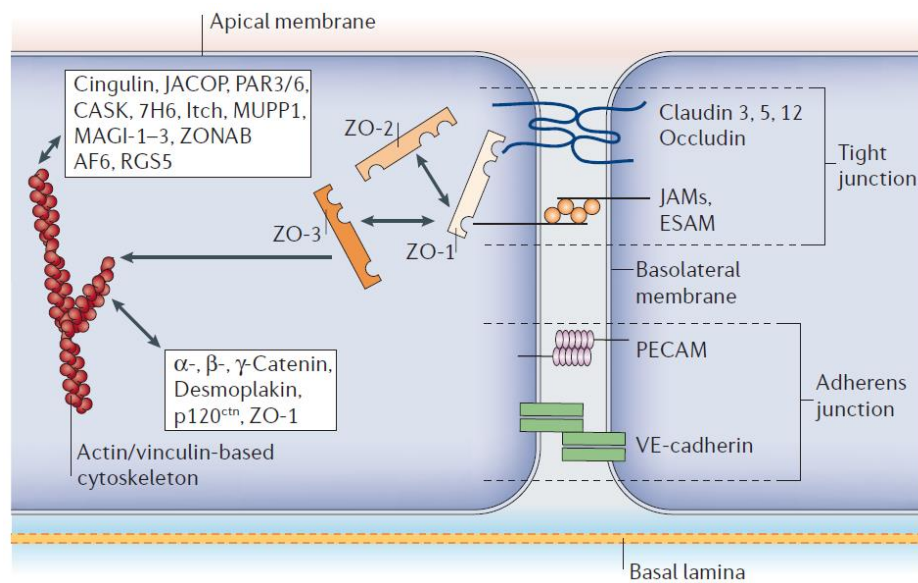


Figure 8 : Schéma représentatif de la voie paracellulaire et des interactions entre les protéines de jonctions serrées après modification de **Abbott 2006** (Abbott et al., 2006). On observe l'association de ZO-1 avec l'occludine et le cytosquelette d'actine, mais également la présence de claudines et d'autres protéines telles que les JAM. Elles interviennent également pour limiter la perméabilité paracellulaire de la BHE

2.1.1.1 Les Claudines

Les claudines sont essentielles aux jonctions serrées, ce sont des phosphoprotéines de 20-27 kDa, les claudines sont composées de quatre domaines transmembranaires, de deux boucles extracellulaires et de deux queues N- et C-terminales intracellulaires. Elles s'associent en dimères à l'aide de leurs boucles extracellulaires (Bazzoni and Dejana, 2004; Ronaldson and Davis, 2015). Les claudines permettent l'interaction des cellules endothéliales adjacentes, et réduisent

l'espace entre les cellules endothéliales, augmentant ainsi l'étanchéité (Ronaldson and Davis, 2015). Au sein de la barrière hémato-encéphalique, on retrouve plusieurs types de claudines telles que les claudines-1 -3 -5, mais c'est la claudine-5 qui reste prépondérante au niveau des cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux (Bernacki et al., 2008; Huber et al., 2001; Ogunshola, 2011). Une augmentation de l'expression de cette claudine-5 au niveau endothélial est associée à une diminution de la perméabilité endothéliale (Ohtsuki and Terasaki, 2007), tandis que chez un rat knockout pour cette claudine, on observe une augmentation de cette perméabilité (Nitta et al., 2003). Ceci semble confirmer que cette protéine, la claudine joue un rôle majeur dans l'étanchéité de la voie paracellulaire, et la formation des jonctions serrées de la barrière physique de la BHE (Dyrna et al., 2013; Wilhelm et al., 2011).

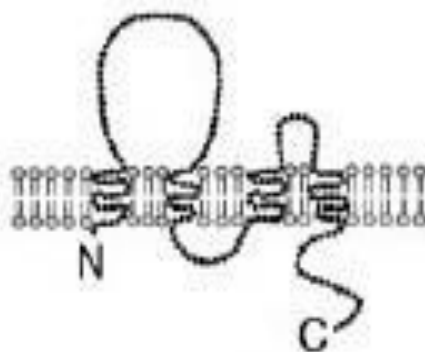


Figure 9 : Structure des protéines de type Claudines d'après **Schneeberger et al (Schneeberger and Lynch, 2004)**. La famille des claudines est composée des 4 domaines transmembranaires, 2 boucles extracellulaires, et des queues intracellulaires de types C- et N-terminales.

2.1.1.2 L'Occludine

Cette protéine est la première protéine transmembranaire à avoir été décrite (Furuse et al., 1993). Et contrairement aux claudines, qui sont considérées comme des structures vitales dans la formation des jonctions serrées, la protéine occludine semble être une protéine de support (Hawkins and Davis, 2005). Ce sont des phosphoprotéines monomériques de 60-65 kDa, qui sont fortement exprimées par les cellules endothéliales des vaisseaux du SNC. Elles sont composées de trois domaines cytoplasmiques, quatre transmembranaires et deux queues N- et C- terminale

intracellulaires, ainsi que deux boucles extracellulaires. Grâce à leur extrémité C-cytoplasmique, elles s'associent aux cytosquelettes des cellules endothéliales. Cette association nécessite de passer par l'intermédiaire des domaines Guanylkinase et des protéines cytoplasmiques tels que les zonula occludens (ZO) (Hawkins and Davis, 2005). C'est l'état de phosphorylation de l'occludine, qui régule son influence dans l'étanchéité de la BHE, leur conférant alors le rôle de modulateur de la formation des jonctions (Dyrna et al., 2013).

Bien que leur phosphorylation semble nécessaire à la formation des jonctions, notamment sur les résidus sérine-thréonine (Sakakibara et al., 1997), l'occludine peut former un dimère afin de participer à l'étanchéité paracellulaire, et de maintenir une résistance électrique transendothéliale faible (TEER), et ce sans phosphorylation. Leur altération est associée à une dérégulation de la barrière, et leur surexpression peut entraîner une diminution de la perméabilité ainsi qu'une plus importante TEER (Persidsky et al., 1997). Des études ont néanmoins montré que la protéine occludine n'est pas essentielle pour former les jonctions serrées, même si dans de nombreuses pathologies, on associe la diminution de l'occludine à une perte de perméabilité (Bolton et al., 1998; Brown et al., 2007). Cependant, Saitou et al, a montré que l'occludine aurait un rôle plus important dans la régulation du flux de calcium à travers la BHE et donc dans la contraction des vaisseaux sanguins (Saitou et al., 2000).

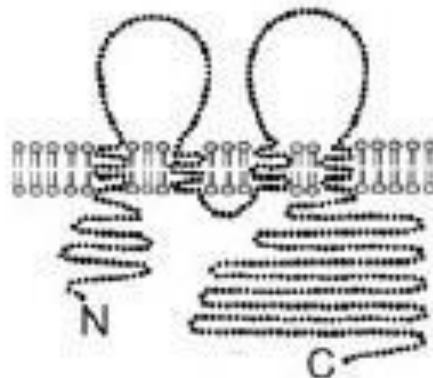


Figure 10 : Structure de la protéine Occludine d'après **Schneeberger et al (Schneeberger and Lynch, 2004)**. L'occludine est composé des 4 domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires, et des extrémités intracellulaires de types C- et N-terminales.

2.1.1.3 Les Zonula occludens

Les Zonula Occludens sont les principales protéines cytoplasmiques, qui permettent le maintien du complexe interactionnel entre les protéines cytoplasmiques et celles du cytosquelette (Bernacki et al., 2008). Au même titre, d'autres protéines telles que les cingulines ou les protéines AF-6, sont également capables d'interagir entre elles ou directement avec les zonula occludens. L'intérêt physiologique de ces protéines et de leurs interactions est de réguler la formation et le maintien des jonctions (Hawkins and Davis, 2005). Les Zonulas occludens interviennent également dans la transduction du signal et la modulation transcriptionnelle (Bauer et al., 2010), ainsi que dans l'inhibition de certaines voies de signalisations.

Les zonula occludens sont des protéines cytoplasmiques appartenant à la famille des MAGGUK (Membrane associated guanylate kinase-like). Au niveau endothélial, on retrouve majoritairement 3 types de Zonula occludens, de ZO-1 à ZO-3. Chacune possède des domaines PDZ (post synaptic density protein), GK (guanyl kinase-like), et SH3 (SRC homology 3) qui leurs permettent l'association aux autres protéines transmembranaires mais également au cytosquelette, ce qui favorise la formation d'un complexe protéique. Les isoformes ZO-2 et ZO-3 sont des phosphoprotéines cytoplasmiques retrouvées au niveau des cellules endothéliales dont la fonction est encore très peu connue. ZO-2 est une protéine homologue à ZO-1 de 160kDa qui joue un rôle dans les signaux de transcription et que l'on retrouve au niveau endothélial. ZO-3 est une protéine de 13kDa retrouvée dans certaines jonctions serrées mais pas encore au niveau de la barrière hématoencéphalique (Inoko et al., 2003)

La protéine cytoplasmique la plus étudiée à ce jour et qui a été localisée au niveau de la BHE est la protéine ZO-1, c'est une phosphoprotéine de 220 kDa qui interagit avec les autres protéines du complexe de jonctions serrées. Ces interactions se font notamment avec les filaments d'actines du cytosquelette, par l'intermédiaire de l'extrémité C-terminale de ZO-1 (Bernacki et al., 2008), ce qui joue un rôle dans le maintien et la fonction des jonctions serrées. Son interaction avec les protéines transmembranaires telles que la protéine claudine-5 via son domaine PDZ-1 et

l'Occludine via son domaine GK renforce l'étanchéité de la voie paracellulaire (Dyrna et al., 2013). De plus, la protéine ZO-1 est un médiateur d'information permettant la communication entre les jonctions serrées et le milieu intracellulaire et vice versa (Hawkins and Davis, 2005). Lors de la dissociation entre les protéines transmembranaires et les protéines ZO1, on observe une augmentation de la perméabilité à travers cette voie de la BHE (Abbruscato and Davis, 1999).

Les protéines des jonctions serrées sont importantes pour la voie paracellulaire et certaines d'entre-elles, telles que ZO-1 sont capables d'interagir avec le cytosquelette de la cellule mais également avec d'autres complexes de jonctions, comme les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes.

2.1.2 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont situées au niveau apical, non loin des jonctions serrées. Elles jouent un rôle important dans la localisation et la stabilisation des jonctions serrées (Sandoval and Witt, 2008). Ces jonctions sont spécialisées dans l'interaction des cellules-cellules. Elles permettent l'adhésion entre les cellules endothéliales et l'inhibition de contact pendant la croissance vasculaire (Hawkins and Davis, 2005). Elles sont notamment formées par des protéines transmembranaires telles que les cadhérines et les **caténines**. Ces dernières jouent un rôle analogue au Zonula Occludens, elles permettent d'ancrer les cadhérines aux protéines d'actine du cytosquelette (Ballabh et al., 2004; Hawkins and Davis, 2005). En effet les β -, α -caténines se lient aux VE-cadhérines (Vascular Endothelial-Cadherin ou plus connues sous le nom de cadhérine-5), stabilisant ainsi la jonction adhérente au cytosquelette.

Les **cadhérines** sont des glycoprotéines transmembranaires, composées d'une seule chaîne, qui interagissent avec du calcium pour permettre l'adhésion aux cellules adjacentes (Dejana and Del Maschio, 1995). La VE-cadhérine est une cadhérine spécifique exprimée à la surface des cellules endothéliales. Mais les VE-cadhérines interagissent avec des protéines de signalisation des cellules endothéliales, telles que le récepteur 2 du VEGF et/ou les protéines de la voie de signalisation des phosphatidylinositol-3-kinases (Bazzoni, 2006; Bazzoni and Dejana, 2004). Les cellules endothéliales sont majoritairement composées de jonctions adhérentes de type

VE-cadhérine mais d'autres cadhérines sont également exprimées, tels que les N-cadhérine. Celles-ci sont regroupées sur la partie basale des cellules endothéliales, qui est la partie en contact avec les astrocytes et les péricytes. Williams et al. ont identifié une région extracellulaire, responsable de l'activation de récepteurs et capable d'induire une croissance cellulaire. Les cadhérines sont exprimées par les cellules endothéliales, impliquant des isoformes de type N-cadhérine qui interviendraient dans la modulation de l'angiogenèse (Williams et al., 2001). Les jonctions adhérentes présentes au sein des cellules endothéliales jouent un rôle important pour maintenir l'étanchéité de l'endothélium cérébrale. D'ailleurs, elles ont un rôle majeur dans l'adhésion des molécules inflammatoire et leur surexpression induit une augmentation du passage des molécules cytotoxiques inflammatoires (Chaitanya et al., 2012).

2.1.3 Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes sont les autres types de jonctions qui interagissent avec les complexes de jonction serrée. Elles sont autrement appelées « gap junction », et elles forment des canaux qui communiquent directement avec le cytoplasme des cellules adjacentes. Ces canaux permettent le passage des petits solutés tels que les ions ou les messagers secondaires (Evans and Martin, 2002). Elles sont formées par deux héli-canaux, appelés les connexines, qui sont issues de deux cellules adjacentes et qui constituent ces canaux. La connexine est une protéine formée par six connexons qui forment un héli-canal. Plusieurs iso-formes existent pour ces connexines et au niveau des cellules de l'endothélium cérébral, les plus exprimées sont les connexines de type -40, et -37 (Bazzoni and Dejana, 2004; Saez et al., 2003). La fonction majeure des gaps jonction est de permettre une communication directe entre les cellules. Néanmoins les connexines interviennent dans de nombreuses voies de signalisation en relâchant, de manière paracrine des signaux tels que de l'ATP (adénosine tri-phosphate), et du monoxyde d'azote (Saez et al., 2003). De plus les connexines semblent co-localisées avec les protéines de jonctions serrées, dans le but de stabiliser la communication entre les cellules et le maintien de l'intégrité de la BHE, mais les mécanismes restent peu connus (Gaete et al., 2014).

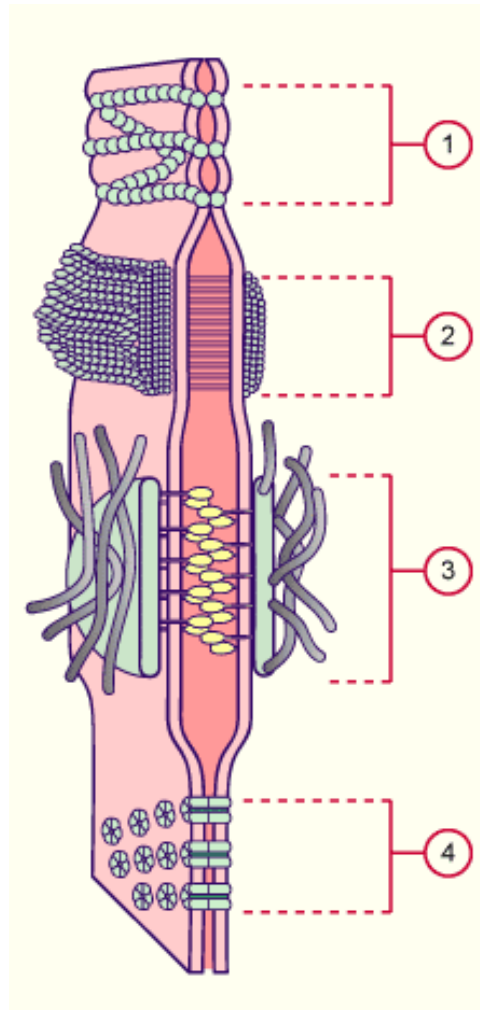


Figure 11 : Représentation des différents complexes de jonctions. 1. Représentation schématique des jonctions serrées. 2. Et 3. Représentation des différents types de jonctions adhérentes. Et 4. Représentation des jonctions communicantes et de leur système de canaux permis par les connexines. D'après M. Adé-Damilano 2005-2006 Université de Fribourg, Département de Médecine, Unité d'anatomie. (Source internet : <https://www3.unifr.ch/apps/med/elearning/fr/epithel/epithel05.html>).

L'ensemble de ces complexes protéiques permettent de limiter le passage entre les cellules, c'est grâce à eux que les cellules endothéliales régulent la perméabilité paracellulaire, permettant ainsi à la BHE de s'adapter à son environnement. Cette restriction limite également le passage des nutriments vitaux pour le cerveau. C'est pourquoi les cellules endothéliales possèdent des systèmes de transports spécifiques, afin de communiquer, de nourrir et encore de protéger le SNC des composés circulants et potentiellement neurotoxiques

2.2 Le passage transcellulaire

Les jonctions entre les cellules endothéliales, permettent de former les vaisseaux et jouent un rôle essentiel dans la restriction du transport paracellulaire. Il a été montré que seules les petites molécules et/ou les molécules lipophiles, comme l'oxygène, le dioxyde de carbone traverse la barrière paracellulaire décrite précédemment. Cependant, pour son bon fonctionnement le SNC a besoin d'apport de molécules telles que les acides aminés, ou encore le glucose. Ces derniers ne pouvant pas traverser librement par la voie paracellulaire, il existe un second type de dispositif de transport, qui peut être facilité ou actif à travers la barrière : c'est le transport transcellulaire (Grieb et al., 1985). Cette voie transcellulaire définit le passage des molécules (et sa régulation) à travers le cytoplasme des cellules grâce à des systèmes de transports spécifiques.

La BHE est décrite comme la principale protection contre le passage des composés insolubles à travers la membrane lipidique. Or l'environnement du SNC est sensible et il est essentiel que l'endothélium facilite le passage de certains nutriments essentiels au bon fonctionnement du système nerveux central. C'est pourquoi on retrouve au niveau abluminal de la membrane plasmique des cellules endothéliales de nombreux systèmes de transports, qui permettent le passage des acides aminés, du glucose, ... ou la sortie des composés potentiellement cytotoxiques (Hawkins et al., 1995, 2006). Afin de permettre le passage de ces nutriments et des protéines de haut poids moléculaire, il existe 3 systèmes alternatifs de transport :

- ✚ La diffusion passive
- ✚ La transcytose
- ✚ Les transports spécifiques tels que les pompes d'efflux que nous décrirons plus en détail au paragraphe 2.2.3.

Ces systèmes de transport permettent le maintien et la régulation des échanges entre le compartiment cérébral et le flux sanguin, toujours dans le but de maintenir l'homéostasie du système nerveux central.

2.2.1 La diffusion passive en énergie

L'un des premiers systèmes de transport est la diffusion libre, passive, et sans consommation d'énergie (ATP) à travers la barrière. Elle se fait suivant un gradient de concentration, c'est-à-dire du plus concentré vers le moins concentré. A travers la BHE, seules les molécules lipophiles et les gaz sont capables de diffusion passive (Abbott et al., 2010), c'est le cas par exemple du dioxygène qui pénètre dans le compartiment cérébral pour répondre aux besoins du SNC.

Cependant, il existe une diffusion dite **facilitée**, qui est passive en énergie, c'est-à-dire qui ne nécessite pas d'hydrolyse d'ATP. Néanmoins cette diffusion met en jeu des protéines de transports spécifiques. Ce qui rend son mécanisme saturable. En effet lorsque la concentration en molécules à transporter devient supérieure à l'affinité de son transporteur lui-même, alors les molécules ne peuvent plus être transportées à travers l'endothélium. Ce système de transport permet, dans le cas de la BHE, de transporter les nutriments nécessaires au métabolisme du cerveau tels que le glucose et les acides aminés (Daneman and Prat, 2015).

En effet le transport du **glucose**, va se faire par diffusion facilitée. Le glucose est essentiel au système cérébral, car il représente la principale source d'énergie du cerveau. Il est transporté par l'intermédiaire de protéines spécifiques, les GLUT. GLUT-1 (45kDa) est le principal transporteur que l'on retrouve exprimé au niveau de la BHE. Sa répartition est asymétrique, avec une prédominance d'expression sur la face luminale (Simpson et al., 2007). Cependant lors de troubles neurologiques, une dérégulation de ce transporteur, GLUT-1, entraîne la diminution du taux de glucose dans le cerveau, ce qui engendre une augmentation de la perméabilité de la BHE (Keaney and Campbell, 2015).

Les **acides aminés** sont également vitaux pour le bon fonctionnement du SNC, ils interviennent dans la synthèse protéique et la production de neurotransmetteurs. Cependant le cerveau ne produit pas les acides aminés essentiels, leurs apports se fait donc via l'alimentation et la circulation sanguine. Les acides aminés sont pris en charge par des transporteurs spécifiques leur permettant de traverser les cellules endothéliales de la BHE (O'Kane et al., 2006).

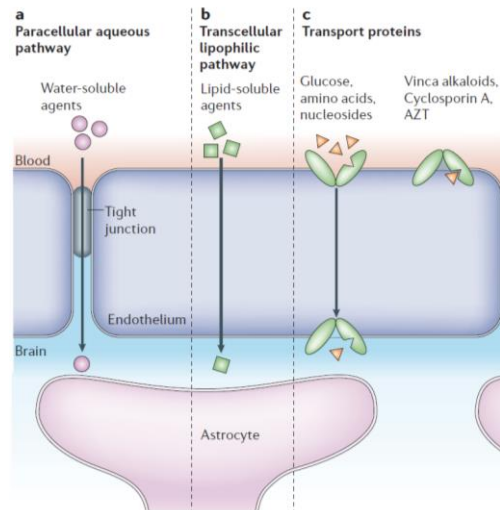


Figure 12 : Illustration schématique des mécanismes de transport transcellulaire retrouvés au niveau de la BHE modifiée par **Abbott et al (Abbott et al., 2006)**. Le passage paracellulaire étant limité par les jonctions serrées, les composés circulants vont devoir traverser la cellule avec des systèmes de transport transcellulaire, ici le transport du glucose et des acides aminés (c).

2.2.2 La transcytose vésiculaire

La transcytose est un processus minoritaire et lent. Il permet le transport de macromolécules et de protéines par un mécanisme en plusieurs étapes, tout d’abord la liaison à la membrane cellulaire, ensuite l’endocytose du composé par invagination de cette membrane cellulaire, formant ainsi une vésicule et enfin l’exocytose du côté opposé de cette vésicule tout juste formée.

Au niveau de la barrière hématoencéphalique cette transcytose peut se faire soit par **adsorption**, lorsque les charges positives sont en excès. Dans ce cas une interaction se fait avec les cellules endothéliales qui sont chargées négativement, permettant alors une endocytose et la formation d’une vésicule. Cette vésicule va pouvoir se transloquer jusqu’à la membrane opposée pour faire une exocytose, libérant alors le contenu de la vésicule (Abbott et al., 2010).

Elle se fait également par des vésicules **dépendantes de récepteur**. Lors de ce type de transcytose, les molécules se fixent sur leurs récepteurs spécifiques au niveau de la membrane endothéliale ce qui permet l’internalisation des molécules et leurs transferts jusqu’à la membrane opposée (Abbott et al., 2010). Ces deux processus

doivent se faire en contournant la voie des lysosomes pour que son contenu ne soit pas dégradé.

Ce phénomène est très peu retrouvé en physiologie mais lors d'une hypoxie, il va avoir une augmentation du nombre de ces vésicules de transcytose (Daneman, 2012; Keller, 2013).

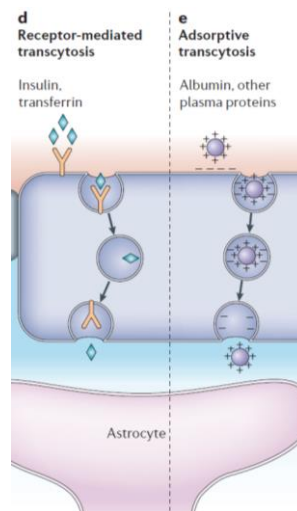


Figure 13 : L'illustration schématique des mécanismes de transport transcellulaire retrouvés au niveau de la BHE modifiée par Abbott et al (Abbott et al., 2006): les mécanismes de transcytose dépendant de récepteur (d) et la transcytose par adsorption (e).

2.2.3 Les pompes d'efflux

L'unité neurovasculaire, et principalement sa composante endothéliale possède des systèmes de détoxification de l'environnement cérébral au niveau apical et basal. Ce sont des systèmes de transports enzymatiques intracellulaires et extracellulaires, qui métabolisent et éliminent les substances étrangères à l'organisme c'est-à-dire les xénobiotiques (Lee et al., 2001). Le principe d'élimination des xénobiotiques repose sur différentes phases de métabolisation intracellulaire. Après que le xénobiotique ait pénétré la membrane cellulaire, il est pris en charge par des enzymes spécifiques, qui transforme le xénobiotique en composés hydrophiles. Puis ces composés hydrophiles sont liés à des molécules de glutathion, principal tri-peptide thiol antioxydant, pour former des composés liés au glutathion. Sous cette forme les composés sont expulsés en dehors de la cellule, au cours d'une phase III, par des protéines de la famille des

ABC transporteurs. Cependant certains de ces xénobiotiques sont des substrats directs de ces transporteurs et vont être expulsés sans passer par les différentes phases de métabolisation.

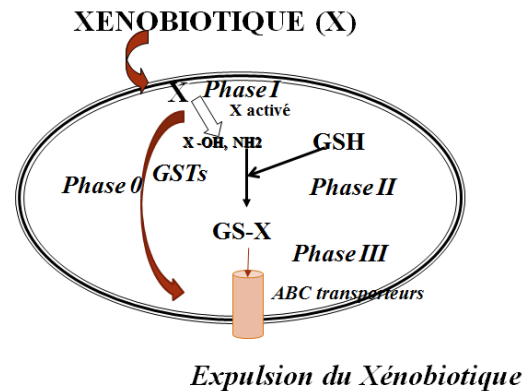


Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme de détoxification cellulaire impliquant les ABC-transporteurs. Description des différentes phases impliquées dans la prise en charge des xénobiotiques. Phase I : transformation en composé hydrophile, phase II : liaison au glutathion, phase III prise en charge par les ABC transporteurs. Phase 0 : phase par laquelle un xénobiotique sera pris en charge directement par les ABC-transporteurs sans passer par les phases I, II, III. D'après **Meister et al et Perek et al (Meister, 1994; Perek and Denoyer, 2002)**.

Au niveau de l'endothélium cérébral, ce système de détoxification rend important l'expression des transporteurs/pompes d'efflux, qui permettent l'excrétion des molécules étrangères et/ou cytotoxiques. Ces pompes participent à la protection du système nerveux central en limitant l'entrée et surtout en favorisant la sortie des substances étrangères et des molécules potentiellement neurotoxiques.

Plusieurs familles de transporteurs d'efflux sont présentes aux niveaux de la barrière, et la famille la plus importante sont les transporteurs de type Adénosine5'-triphosphate Binding Cassette (A(TP)BC- transporteur). Chez l'homme les ABC-transporteurs appartiennent à une superfamille de 49 protéines regroupées en 7 sous famille (ABCA à ABCG), dépendantes de leurs homologues structurales (Vasiliou et al., 2009). Ces pompes d'efflux permettent un passage à contre gradient de concentration, grâce à l'énergie libérée par hydrolyse d'ATP. Ce sont des protéines transmembranaires, et leur transport repose sur la fixation des substrats sur les domaines TMDs (transmembrane protein), qui forment des pores de circulation des molécules, grâce aux hélices α transmembranaire. Ce sont ces mêmes domaines qui

confèrent la spécialité des pompes (Dean et al., 2001). La fixation entre le domaine et le substrat va stimuler les sites ATPasiques du domaine NBDs (nucleotide binding domains) des pompes, localisé dans le cytosol. Ce lien va favoriser l'entrée ou la sortie des molécules dans la cellule (Linton and Higgins, 2007). La structure générale des ABC transporteurs est composée de 2 TMD qui forment le canal sélectif, et qui sont associés à 2 NBD qui catalysent l'hydrolyse de l'ATP. Les pompes d'efflux, sont retrouvées sur la partie luminale de la barrière hémato-encéphalique, et forment une pompe unidirectionnelle, transportant les molécules en direction du compartiment sanguin. En effluant les molécules circulantes potentiellement toxiques pour le cerveau dans le compartiment sanguin, cela permet la protection et la détoxification de la BHE et donc du SNC (Daneman and Prat, 2015).

Les médicaments à visée cérébrale sont des substrats de ces pompes, ce qui limite la distribution cérébrale et l'efficacité de ces médicaments (Potschka, 2010). Et la surexpression de ces pompes au niveau de la BHE conduit à une résistance aux médicaments (Ronaldson and Davis, 2015). Au niveau de la BHE, les ABC-transporteurs les plus représentés sont la « breast cancer resistance protein » (BCRP), la famille des « multidrug resistance associated proteins » (MRP), et la famille des « multidrug resistance protein » (MDR) à laquelle appartient les P-glycoprotéine (P-gp) (Bernacki et al., 2008).

2.2.3.1 P-glycoprotéines (ABCB)

Les P-glycoprotéines (P-gp) furent les premières décrites en 1976 (Juliano and Ling, 1976), et ce furent également les premières à être découvertes au sein de la BHE en 1989 (Cordon-Cardo et al., 1989).

La P-gp aussi nommé ABCB est une glycoprotéine de 170 kDa. On retrouve deux types de P-gp, les P-gp 1 et 2 codés par les gènes MDR 1(a et b) et MDR 2 respectivement. Cependant les P-gp 2 ne sont exprimées que dans les hépatocytes, ce sont donc les P-gp 1 qui seront les plus détaillées dans la suite de ce paragraphe. **Les P-gp 1** sont exprimés dans l'endothélium cérébrale au niveau des capillaires cérébraux et du parenchyme cérébral (Bernacki et al., 2008), mais on également été retrouvés dans une culture primaire d'astrocytes (Declèves et al., 2000) et il semble y en avoir peu au niveau des péricytes (Berezowski et al., 2004). Elles font partie des protéines

qui permettent la résistance aux médicaments en effluant les composés en dehors du compartiment cérébral de la BHE. Une déficience en P-gp chez des souris Knock-out engendre une pénétration accrue des composés dans le compartiment cérébral (Schinkel and Jonker, 2003).

Leur localisation dans l'endothélium est principalement au niveau du site luminal, c'est-à-dire au pôle apical des cellules endothéliales, ce qui permet de limiter la diffusion des molécules du sang vers le cerveau. Ce phénomène influence la régulation de l'entrée et de la sortie des molécules au niveau du compartiment cérébral, limitant ainsi leurs toxicités cérébrales.

La protéine P-gp est composée de 12 domaines transmembranaires TMD (hélice) associés avec 2 domaines NBDs. Les domaines TMD sont importants pour la fixation et le transport des médicaments, ce qui assure la mobilité et l'adaptation de la protéine. L'une des caractéristiques de P-gp est la grande variété de ses substrats qu'ils soient hydrophobes ou non, qu'ils aient des tailles différentes ou des structures différentes (Sharom, 2011), mais également de par leurs mécanismes d'action pharmacologique (Vautier et al., 2006). P-gp agit en suivant deux mécanismes, un mécanisme de translocase et l'autre de flippase (Jagodinsky and Akgun, 2015). Le mécanisme le plus important est la translocase. Ce mécanisme est basé sur la double conformation de la protéine 'inward and outward facing'. La protéine possède également deux sites spécifiques, un site de fixation du substrat du côté cellulaire, et un site en extracellulaire. Le changement de conformation est induit lors de la fixation du substrat et l'hydrolyse d'ATP, ce qui conduit au relâchement du substrat dans le compartiment sanguin. L'autre mécanisme impliqué est le phénomène dit de « flippase », qui consiste à faire passer les substrats d'une face à l'autre de la membrane par un mouvement dit de « flipflop » (Johnstone et al., 2000). En effet, les substrats sont en équilibre de part et d'autre de la membrane plasmique, ce qui forme un gradient de concentration à l'origine de ce transport.

Ce système de transport peut être inhibé via des composés qui interagissent avec P-gp, et qui sont capables de supprimer ou modifier l'efflux des composés. Ces inhibiteurs ont une grande variété de structure. Ils peuvent être compétitifs comme la cyclosporine A, ou ils peuvent prendre la place du substrat sur son site de fixation sans être transporter. L'inhibiteur peut également interagir avec le domaine NBD, ou en

interférant avec l'hydrolyse de l'ATP (Sharom, 2011). Au niveau cérébral, les inhibiteurs ont des intérêts thérapeutiques et sont envisagés comme éléments augmentant la pénétration des médicaments lors du traitement de certaines pathologies. La capacité de cette protéine à interagir avec de nombreux substrats va rendre la conception d'inhibiteur de haute affinité complexe (Sharom, 2011).

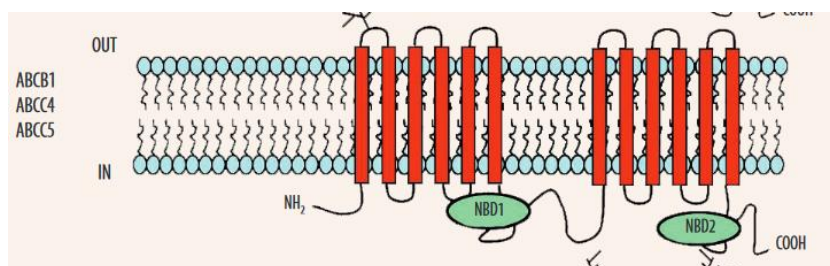


Figure 15 : Illustration de la topologie des transporteurs de la famille des ABCC et ABCB1 qui n'est autre que la protéine P-gp d'après Declèves et Legrand (Declèves, 2009).

2.2.3.2 MRP (ABCC)

La famille des MRP comprend 13 membres mais elles ne sont pas toutes des pompes d'efflux. Seules les 9 premières MRP réalisent du transport actif de type pompes d'efflux, les autres sont des protéines tronquées ou des récepteurs de type canaux (Haimeur et al., 2004). On distingue deux topographies différentes (Kruh and Belinsky, 2003) : les MRP-1-3-6-7 sont composés de 3 domaines TMD, et 2 domaines NBD avec une boucle intra-cytoplasmique à l'extrémité N-terminal, qui est la partie essentielle à la fonction de cette protéine (Bakos et al., 1998). Les autres MRP-4-5-6-9 sont semblables aux précédentes mais sans les domaines TMD. Les MRP-1 à -6 sont exprimés au sein de l'endothélium du tissu cérébral (Kubota et al., 2006; Warren et al., 2009; Zhang et al., 2000).

Les protéines MRP sont responsables du transport d'anions organiques, des métabolites sulfatés, d'éléments conjugués au glutathion, aux métalloïdes, mais également de médicament (Haimeur et al., 2004; Leslie et al., 2005; Ronaldson and Davis, 2015). Un substrat peut être commun à plusieurs MRP. Les protéines MRP sont localisées au niveau de la barrière hémato-méningé et hématoencéphalique (Borst et

al., 2000), et Schinckel et Jonker ont montré que leurs localisations se situent sur la membrane apicale des cellules (Schinkel and Jonker, 2003), ce qui est une position idéale pour permettre la protection du SNC. Cependant on peut les retrouver également en position basale. Au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux humains on retrouve les MRP-1-2-3-5 (Warren et al., 2009). Cependant, en microscopie à fluorescence, on observe uniquement l'expression des MRP-1-4-5 (Nies et al., 2004). L'influence de ces protéines au niveau de la barrière hématoencéphalique est dépendante de leur localisation au niveau de la membrane endothéliale et seules les protéines MRP localisées sur la face apicale jouent un rôle dans la restriction du passage des composés au niveau du compartiment cérébral. Dans cette position-là, celle qui est la plus représentative et qui a fait l'objet de travaux dans cette thèse est l'isoforme 1 (MRP-1).

La protéine MRP-1 ou encore nommé ABCC-1, est une protéine de 190 kDa découverte au sein de la BHE dans les années 2000 (Borst et al., 2000). Les cellules endothéliales, qui possèdent des protéines MRP-1, ont une résistance aux composés naturels mais également à certaines molécules anti-prolifératives par exemple (Breuninger et al., 1995; Cole et al., 1994). Les protéines MRP-1 sont également exprimées par les cellules astrocytaires (Schinkel, 2001). Leur localisation est importante pour la protection du système nerveux central avec une préférence pour la face luminale (Daood et al., 2008). La protéine MRP-1 comme P-gp est une pompe d'efflux qui protège le cerveau avec un rôle dans la détoxification (Davis, 2014). Il existe plusieurs inhibiteurs, parmi eux une molécule le probénécide est classiquement utilisé (Schinkel and Jonker, 2003).

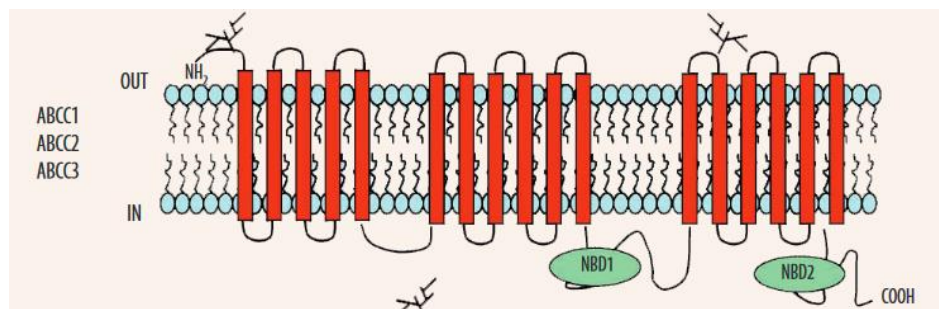


Figure 16 : Illustration de la topologie des transporteurs de la famille des ABCC dont l'ABCC1 qui n'est autre que la MRP-1 d'après Declèves et Legrand (Declèves, 2009).

2.2.3.3 BCRP (ABCG)

Découverte dans une lignée tumorale mammaire (MCF-7) par Doyle en 1998, on lui donne alors la dénomination de « Breast Cancer Resistance Protein » (BCRP). Plus tard, elle sera découverte dans d'autres types cellulaires mais sa dénomination restera. La protéine BCRP est une glycoprotéine de 72 kDa exprimé par différent tissu et organe sain (Robey et al., 2009). Elle possède un domaine TMD et un domaine NBD. Cette protéine fait partie des pompes d'efflux ATP dépendante, avec pour rôle l'efflux des substrats et l'induction de la résistance aux médicaments comme celle décrite précédemment (Allen et al., 1999). Ce sont des demi-transporteurs, qui ont besoin d'être en homo-dimère pour fonctionner.

Les protéines BCRP sont retrouvées au niveau des cellules polarisées telles que les cellules endothéliales des capillaires et des veines (Jonker et al., 2000; Schinkel and Jonker, 2003). Ces protéines ont été retrouvées au niveau de la membrane luminale de la BHE (Cooray et al., 2002). Leur distribution et leur action au sein de l'endothélium de la BHE est semblable à P-gp. En effet, ces deux protéines agiraient ensemble pour effluer les xénobiotiques circulants, protégeant ainsi le SNC comme les autres protéines de la grande famille des pompes d'efflux (Schinkel and Jonker, 2003). Cependant malgré la prédominance de P-gp dans l'efflux, certains auteurs considèrent BCRP comme un élément crucial pour l'efflux des drogues au niveau cérébral (Agarwal et al., 2011). Cependant l'intérêt de cette protéine a toujours été très controversé car certains auteurs pensent que cette protéine est non fonctionnelle (Herwaarden et al., 2003; Lee et al., 2007). Les substrats et les inhibiteurs de BCRP sont communs avec ceux de la protéine P-gp, avec une grande diversité (Löscher and Potschka, 2002), même si certains, comme KO-143, sont décrits comme étant plus spécifiques de cette protéine. La relation étroite entre P-gp et BCRP explique l'intérêt croissant pour les protéines de type BCRP. De plus des études montrent même que BCRP est d'avantage exprimée dans la BHE humaine (Dauchy et al., 2008; Uchida et al., 2011). Des études montrent qu'une déficience en P-gp pourrait entraîner une surexpression de BCRP dans les micro-vaisseaux cérébraux de souris, suggérant un effet compensatoire de BCRP (Cisternino et al., 2004).

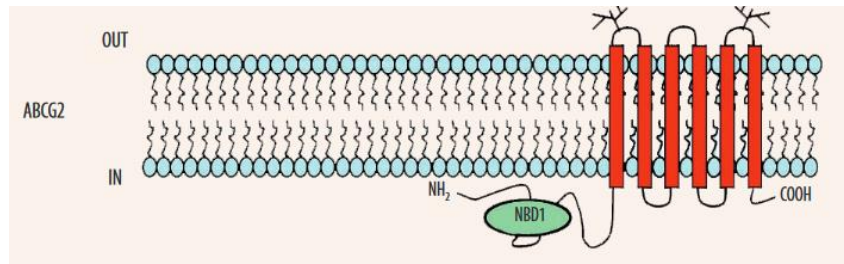


Figure 17 : Illustration de la topologie de la protéine de transport ABCG2 ou encore connue sous le nom de BCRP d'après Declèves et Legrand (Declèves, 2009).

Evidemment, ces pompes ABC transporteurs ne sont pas les seuls systèmes d'efflux au niveau de la barrière hématoencéphalique. D'autres protéines telles que celles appartenant à la superfamille des « **Solute Carriers** » (**SLCs**) sont impliquées et fonctionnent comme des échangeurs de molécules, contre d'autres molécules et/ou ions, impliquant l'existence préalable d'un gradient (Löscher, 2005). Il existe également des systèmes de transports **enzymatiques** qui renforcent cette barrière métabolique. Bien que l'étude de ces autres types de transport soit importante dans l'évaluation de la résistance aux médicaments. Dans le cadre de cette thèse ces autres types de transporteurs ne seront pas plus décrits.

2.2.4 Les aquaporines : le transport de l'eau

Au cours d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil, il a été observé des mouvements liquidiens entre le compartiment circulant et les compartiments interstitiels et intracellulaires. Ces mouvements sont à la base de l'hypothèse de l'altération de la perméabilité de la BHE. Ces mouvements liquidiens seraient principalement liés à un des transferts d'eau à travers cette barrière hématoencéphalique. En effet les molécules d'eau sont capables de traverser en partie grâce au système paracellulaire, c'est-à-dire directement entre les cellules endothéliales, mais ces molécules d'eau peuvent aussi emprunter un passage transcellulaire ainsi que des canaux spécifiques, localisés sur les pieds astrocytaires, tels que les aquaporines.

Les aquaporines sont des protéines transmembranaires hydrophobes qui s'associent entre elles afin de former un canal de passage de d'eau et de solutés (Badaut et al., 2002), et ce passage va se faire en suivant le gradient osmotique.

Chez l'Homme, on dénombre treize aquaporines exprimées dans différents types cellulaires (Sorani et al., 2008). Au sein du SNC, l'aquaporine la plus abondante est l'aquaporine 4, qui est localisée au niveau des pieds astrocytaires et des fentes synaptiques, et qui sont en contact direct avec les cellules endothéliales (Badaut et al., 2014; Verkman, 2002). Cependant au niveau endothélial il a seulement été suggéré que les pores soient présents à proximité des jonctions serrées. Cette aquaporine 4 joue, pourtant un rôle important dans la régulation hydrique au sein de la BHE en conditions pathologiques (Bonomini et al., 2010). Elle est notamment impliquée dans la régulation du volume cérébral, ainsi que dans la formation possible d'œdème secondaire (Chu et al., 2016). Dans ce sens, des études évoquent une modification de l'intégrité des tissus de certaines régions cérébrales tels que la région préfrontale, associée à la régulation des mouvements d'eau de l'extracellulaire vers l'intracellulaire. De cette régulation résulterait alors une dérégulation de la BHE (Kheirandish-Gozal et al., 2018; Macey et al., 2018).

De plus Palomares et al. ont montré une diminution des échanges en eau à travers la BHE chez un sujet SAOS comparé à un sujet contrôle avec une diminution du ratio K_w (ratio entre la surface de perméabilité de l'eau et le volume du capillaire), qui lorsque qu'il est diminué implique une possible diminution de la distribution des aquaporines (Palomares et al., 2015). Tout ceci montrant l'importance du transport d'eau en conditions pathologiques.

L'endothélium micro-cérébral composé des cellules endothéliales cérébrales est le premier décrit sous le nom de BHE, de par son étanchéité paracellulaire et ses systèmes de transports transcellulaires spécifiques. Cette barrière est le point central de l'unité neurovasculaire et joue un rôle majeur dans la protection du SNC. Cependant bien que les cellules endothéliales développent leurs caractéristiques spécifiques seules, il est indispensable de prendre en considération leur environnement cellulaire. En effet l'environnement de cet endothélium influence la mise en place de ces éléments et est

nécessaire pour la bonne protection du SNC. L'environnement cellulaire est principalement composé des astrocytes, des péricytes, des neurones, de la microglie et de la membrane basale.

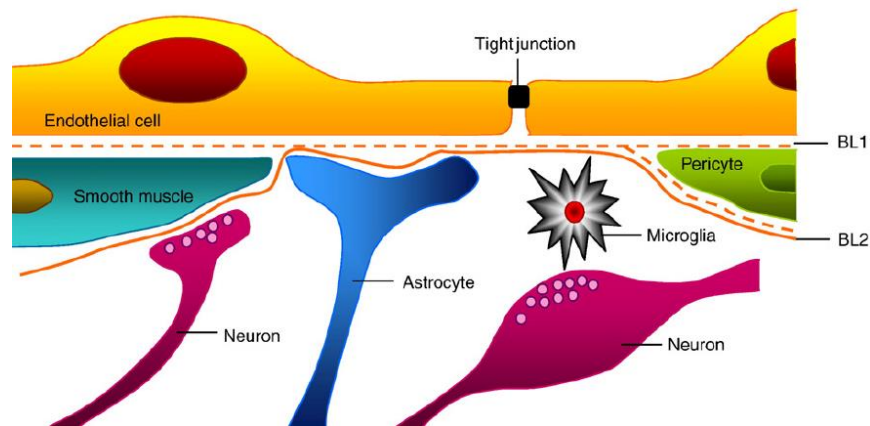


Figure 18 : Illustration des interactions entre l'endothélium et son environnement cellulaire d'après Abbott et al (Abbott et al., 2010).

3. Les astrocytes

Les astrocytes appartiennent aux cellules gliales avec les oligodendrocytes et les cellules microgliales. Les astrocytes sont abondants et proches des cellules endothéliales, ce qui rend leur étude importante par rapport aux autres types cellulaires (Abbott et al., 2006).

Ces cellules ont une forme étoilée caractéristique, avec un prolongement appelé pied à leurs extrémités. Les astrocytes forment un manchon qui recouvre 99% de l'endothélium des capillaires de la BHE. La proximité entre les astrocytes et les cellules endothéliales suggère l'induction et la modification du phénotype des cellules endothéliales par les astrocytes. Les astrocytes libèrent notamment des facteurs solubles, tels que le VEGF (vascular endothelial growth factor), le TGF- β (transforming growth factor) ou encore du bFGF (basic fibroblast growth factor) qui permettent ces modifications (Ogunshola, 2011; Wilhelm and Krizbai, 2014). Les interactions entre les astrocytes et les cellules endothéliales favorisent la formation des jonctions serrées, et de nombreuses études *in vitro* montrent que lorsque l'on cultive

des cellules endothéliales avec des astrocytes on contribue à renforcer les propriétés de la BHE (Dehouck et al., 1990). En effet, Keaney and Campbell en 2015, ont observé que les interactions des pieds astrocytaires avec les pôles basaux des capillaires cérébraux, jouent un rôle dans la régulation de l'activité neuronale, la synchronisation de mouvements des métabolites avec le flux sanguin, ainsi que la vasodilatation (Keaney and Campbell, 2015). D'autres complexes protéiques, tels que le dysglycane-dystrophine permet le lien entre les pieds astrocytaires et la membrane basale. On retrouve également des transporteurs spécifiques de l'eau tels que les aquaporines 4, qui permettent de réguler l'homéostasie aqueuse du SNC (Daneman and Prat, 2015; Haj-Yasein et al., 2011). Au niveau de la membrane luminale des cellules endothéliales, on trouve des protéines spécifiques comme GLUT-1 (transporteur de glucose), des canaux potassiques (Wilhelm and Krizbai, 2014), ou encore P-gp dont l'expression au niveau endothéliale est augmentée en présence des astrocytes (Abbott et al., 2006).

Les astrocytes sont capables de communiquer avec l'endothélium cérébral afin de modifier sa morphologie et sa fonction. Au niveau de la BHE, les astrocytes permettent de réguler les jonctions serrées, mais aussi l'expression et la polarisation des transporteurs tel que les protéines P-gp (Dehouck et al., 1990; Haseloff et al., 2005; McAllister et al., 2001; Rubin et al., 1991). La communication de l'endothélium cérébral avec les astrocytes est donc essentielle au phénotype de la BHE, que ce soit pour former une barrière étanche, ou fonctionnelle. Cette communication joue également un rôle dans l'angiogenèse que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques (Daneman et al., 2009; Prat et al., 2001). Les astrocytes vont en effet être capables d'activer des voies de signalisations telles que la voie Hedgehog ou encore de sécréter des facteurs tels que le VEGF. Le voie Hedgehog permet l'augmentation de l'expression de protéines de jonctions (Alvarez et al., 2011). Tandis que lors d'une condition inflammatoire par exemple, la production de VEGF, entraîne une diminution de la stabilité de la BHE (Argaw et al., 2009, 2012). L'interaction des astrocytes avec les cellules endothéliales permet d'induire une augmentation de la résistance électrique transendothéliale (TEER) et des propriétés d'imperméabilité de la BHE (Arthur et al., 1987; Janzer and Raff, 1987; Stewart and Wiley, 1981). Cependant il semblerait, que leurs contacts avec les complexes de jonction ne soient pas indispensables pour l'imperméabilité de la barrière (Felts and Smith, 1996; Jaeger

and Blight, 1997). Des études ont montré que les astrocytes peuvent sécréter de nombreuses molécules, telles que les alipoprotéines E, qui ont un rôle régulateur de jonctions serrées par l'intermédiaire de leur récepteur que l'on retrouve à la membrane des cellules endothéliales (Nishitsuji et al., 2011). Par ailleurs, les cellules endothéliales influencent les astrocytes et les précurseurs neuronaux en libérant des facteurs tels que LIF (leukemia inhibiting factor), qui joue un rôle sur la différenciation des astrocytes *in vivo* (Mi et al., 2001). La culture d'astrocytes et de cellules endothéliales augmente l'expression de certaines enzymes qui régulent le comportement face au stress oxydatif par exemple (Schroeter et al., 1999).

Outre la communication avec les astrocytes, l'endothélium micro-vasculaire interagit également avec un autre type cellulaire : les péricytes.

4. Péricytes

Les péricytes sont des cellules plates, non différenciées du tissu conjonctif contractile. Les péricytes et les cellules endothéliales ont la même membrane basale. Ils recouvrent une partie de la surface abluminale permettant le maintien de l'endothélium (von Tell et al., 2006). Il a été montré que les péricytes pourraient réguler le flux sanguin des capillaires grâce à leurs capacités contractiles, liées à la présence de protéines contractiles, cependant ce phénomène reste controversé (Bandopadhyay et al., 2001; Peppiatt et al., 2006).

Les prolongements des péricytes recouvrent 20 à 30% de la surface des micro-vaisseaux (Bonkowski et al., 2011). Comparé à la périphérie, il y aurait au niveau des capillaires un ratio de 1 péricyte pour 3 cellules endothéliales (Daneman and Prat, 2015; Keaney and Campbell, 2015). Leur localisation laisse à penser que leur rôle est important, cependant leur impact sur le phénotype de BHE reste flou. Des études *in vitro* et *in vivo* montrent son importance dans l'amélioration du fonctionnement de la BHE (Hayashi et al., 2004; Hori et al., 2004), notamment la régulation du transport vésiculaire, la formation des jonctions serrées et la polarisation astrocytaire (Armulik et al., 2010). Il joue même un rôle important dans la différenciation endothéliale durant la vie fœtale et cela avant l'implication astrocytaire (Armulik et al., 2010).

L'unité neurovasculaire (NVU) est composée de différents types cellulaires, et chacune de ces cellules est en capacité d'établir une communication-interaction avec

les cellules endothéliales ce qui amène à la modulation du phénotype de BHE. C'est le cas **des péricytes**, leurs interactions avec l'endothélium cérébral, permet d'augmenter la TEER dans des modèles *in vitro* de barrière (Dente et al., 2001). De plus, les péricytes interviendraient dans le développement de la barrière avant les astrocytes, en permettant le contrôle des protéines de jonctions et la régulation du transport vésiculaire (Daneman et al., 2010). Les péricytes sont importants dans les propriétés d'inhibition de la barrière avec modification de la transcytose et de la filtration immunitaire. Au cours du vieillissement, la diminution du taux de péricytes est corrélée avec une diminution de l'expression des jonctions serrées telles que l'occludine, la claudine-5 et la protéine zonula occludens 1 (Bell et al., 2010), entraînant une augmentation du passage paracellulaire et régulant l'entrée des molécules neurotoxiques dans l'espace péri-vasculaire induisant une neuro-dégénérescence (Bell et al., 2010; Winkler et al., 2011).

5. Les Neurones

Les neurones ont longtemps été mis de côté pour leur rôle dans la formation ou la régulation de la BHE, mais les neurones sont l'unité fonctionnelle du système nerveux, composés d'un corps cellulaire autrement appelé soma, et de ses prolongements : les dendrites et l'axone. Ils sont sensibles aux modifications environnementales, et communiquent les informations sensibles et motrices à d'autres neurones ou cellules excitables, afin de répondre correctement aux stimuli perçus. Les cellules endothéliales cérébrales sont innervées par ces différents types de neurones, qu'ils soient noradrénergique, sérotoninergique (Cohen et al., 1997), cholinergique (Tong and Hamel, 1999), ou encore GABAergique (Vaucher et al., 2000). La perte des certaines innervations, notamment cholinergique pourrait être associée à une altération cérébrovasculaire (Tong and Hamel, 1999). Lee et al. ont d'ailleurs montré que la communication entre les neurones et les cellules endothéliales pourrait moduler la perméabilité de la BHE et ils ont décrit l'augmentation de la perméabilité comme un mécanisme compensatoire spécifique (Lee et al., 1999). La formation des jonctions serrées serait initiée par les neurones ou les cellules progénitrices cérébrales (Daneman et al., 2010; Saunders et al., 2000). Tontsch et al. ont également démontré l'induction de l'expression d'enzymes spécifiques aux cellules endothéliales cérébrales en présence de neurones (Tontsch and Bauer, 1991). De plus la culture de cellule

endothéliale avec des précurseurs neuronaux entraîne une plus grande étanchéité paracellulaire et une augmentation de la TEER (Weidenfeller et al., 2007). Même si l'implication des neurones dans l'induction du phénotype de la barrière n'est pas encore démontrée aujourd'hui, il semblerait que l'influence des neurones sur les fonctions de cette barrière soit quand même une réalité.

6. La Microglie

Décrite dès 1920 par Del Rio Hortega, les cellules microgliales sont des cellules de l'immunité innée retrouvée dans le SNC (Pérez-Cerdá et al., 2015). Elles représentent 5% de la population cellulaire cérébrale, et elles agissent comme l'une des premières lignes de défense. En condition normale, les cellules de la microglie sont ramifiées et expriment des molécules de phagocytose, permettant l'élimination des déchets relargués par les neurones (Venneti et al., 2009). Après une lésion cérébrale ou un stimulus inflammatoire, ces cellules peuvent s'activer. Une fois active, la microglie sécrète des cytokines proinflammatoires, telles que : IL-1 β , TNF- α (Tumor necrosis factor) mais aussi des espèces réactives de l'oxygène. Leur activation peut être liée à la réparation tissulaire, ou à la phagocytose de neurones endommagés et des xénobiotiques. Quand elles s'activent, elles sécrètent des chimiokines, du VEGF, ou active des voies neurotrophiques (Aguzzi et al., 2013) en modifiant leur morphologie (Rock and Peterson, 2006). Au niveau de la barrière, les microglies influent sur les propriétés de maintien de l'homéostasie, même si ces mécanismes sont peu connus (Choi and Kim, 2008). A l'inverse, l'endothélium micro-vasculaire peut activer la microglie en sécrétant différents facteurs.

7. La membrane basale/lame basale

Les cellules endothéliales se servent de cette lame comme d'un support, d'un point d'ancrage pour les processus de signalisation. Principalement constituée de laminine, de collagène de type IV et de fibronectine, on y retrouve également des protéoglycanes et des glycoprotéines, qui permettent de prendre en charge des éléments anioniques. C'est une deuxième barrière contre les molécules pouvant passer dans le tissu neuronal. Contrairement à ce que l'on trouve au niveau du système nerveux périphérique la membrane basale du SNC entoure les vaisseaux sanguins de deux couches L'une interne est sécrétée par les cellules endothéliales et les péricytes,

et l'autre externe est parenchymateuse, elle est secrétée par les astrocytes (Daneman and Prat, 2015). Ces deux types de membranes diffèrent de par leurs compositions moléculaires, leur couche externe étant plus riche en laminine $\alpha 1$ et $\alpha 2$, tandis que leur couche interne serait majoritairement composée de laminine $\alpha 4$ et $\alpha 5$ (Daneman, 2012). Elle permet donc l'ancrage des cellules endothéliales, grâce à l'interaction entre la laminine et l'intégrine des cellules endothéliales (Hawkins and Davis, 2005).

Au niveau de son rôle au sein de la BHE, la membrane basale semble favoriser l'expression de protéines de jonctions de l'endothélium (Savettieri et al., 2000). Leurs connexions semblent également activer différentes voies de signalisations intracellulaires (Tilling et al., 2002). Ainsi l'altération de la laminine peut permettre le passage de péricyte d'un état de repos à un phénotype contractile, entraînant alors une diminution de l'expression de protéines de jonctions (Yao et al., 2014). En condition pathologique, la perte de stabilité de cette membrane basale conduit à une augmentation de la perméabilité de la BHE, et donc *a posteriori* à la rupture de cette BHE (Jian Liu and Rosenberg, 2005; Lakhan et al., 2013; Rascher et al., 2002; Wang and Shuaib, 2007).

8. La modélisation *in vitro*

La BHE est la première ligne de défense du SNC, c'est pourquoi dans de nombreuses pathologies, elle est aussi la première affectée. Comme décrit précédemment la barrière hématoencéphalique a une organisation complexe, composée de plusieurs types cellulaires qui vont permettre le maintien et la régulation de la fonction de cette BHE. Cette complexité rend également difficile le traitement d'un certain nombre de pathologies, telles que le SAOS. Afin d'améliorer l'efficacité des traitements, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu au niveau de la BHE. La complexité des interactions aux niveaux des structures du cerveau et de la BHE rend leurs études *in vivo* difficiles. C'est pourquoi on a vu émerger des modèles *in vitro*, qui sont aujourd'hui de plus en plus développés, du fait de leurs reproductibilités, de leurs caractères contrôlables, de leurs coûts mais également des questions éthiques moins contraignantes. Grâce à ces modèles *in vitro*, nous sommes aujourd'hui capables d'étudier des mécanismes cellulaires et moléculaires ciblés, tout en restant proche de la physiologie *in vivo* (Cecchelli et al., 2007). Ils ont permis l'amélioration des connaissances pendant de nombreuses années,

notamment sur la régulation des pompes d'efflux et sur la contribution des différents types cellulaires dans le fonctionnement de la BHE (Ogunshola, 2011). Ces modèles restent néanmoins une première approche de l'organisation complexe du cerveau et de ses structures, qu'il est nécessaire de compléter par des études plus physiologiques et intégratives avec des modèles *in vivo*. Ces différents modèles de BHE *in vivo* et *in vitro* ont fait l'objet d'une revue récente par Jackson et al. en 2019 (Jackson et al., 2019).

La BHE sépare deux compartiments, le compartiment sanguin et le compartiment cérébral. Afin de pouvoir être représentatif, les modèles *in vitro* de la BHE doivent prendre en considération ces deux compartiments, d'où l'utilisation d'un insert, c'est-à-dire une membrane micro poreuse, qui permet de créer des échanges entre les compartiments, mais qui limite la migration cellulaire entre ces compartiments. Néanmoins, afin de faire des recherches à partir de ces modèles, il existe des critères d'acceptation, justifiant que le modèle soit proche des conditions *in vivo*.

Le premier critère, qui est de loin, l'un des plus importants, est l'étanchéité (Naik and Cucullo, 2012). On évalue cette étanchéité de deux manières, d'une part en mesurant la résistance électrique transendotheliale (TEER) et d'autre part en mesurant la perméabilité membranaire avec des marqueurs spécifiques.

La TEER se mesure à l'aide de 2 électrodes, l'une plus grande que l'autre, ces deux électrodes vont aller de part et d'autre de l'insert. La TEER informe sur le passage des ions par la voie paracellulaire. Plus cette TEER augmente, plus le modèle est étanche. Cependant cette mesure reste peu reproductible, elle dépend de l'expérimentateur, et de paramètres tels que la température. En fonction du type de modèle cellulaire la TEER attendue est, en fonction de la littérature, différente. En effet, pour le modèle de BHE humaine une TEER d'environ $40 \Omega/\text{cm}^2$ a été acceptable (Eigenmann et al., 2013; Helms et al., 2016), tandis que pour un modèle murin de qualité la TEER avoisinait les $100 \Omega/\text{cm}^2$ (Naik and Cucullo, 2012).

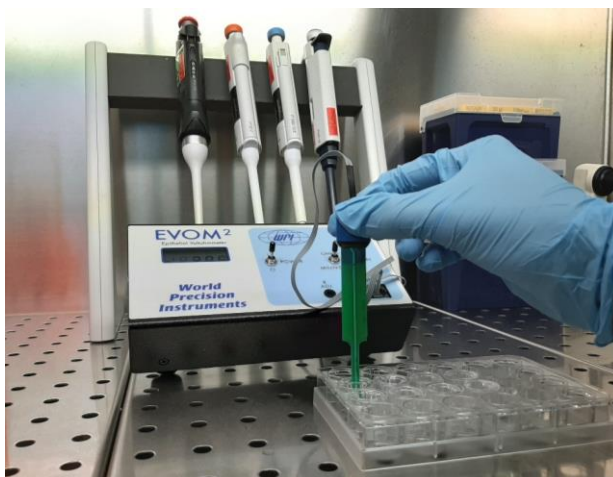


Figure 19 : Photo de l'appareil de mesure de la résistance électrique transendothelial utilisé pour valider les modèles *in vitro* mis en place.

La perméabilité membranaire apparente informe quant à elle sur la capacité des petites molécules hydrophiles, tels que le sodium fluorescéine (Na-FI : 376 Da) à traverser cette barrière, et ce, sans l'utilisation des transporteurs spécifiques tels que les pompes d'efflux (Wilhelm and Krizbai, 2014). Pour être validée, la perméabilité du modèle mise en place doit être proche de celle retrouvée *in vivo*, c'est-à-dire dans un ordre de grandeur de $\times 10^{-6} \text{cm.s}^{-1}$ (Bickel, 2005; Wilhelm and Krizbai, 2014). Cette mesure de perméabilité apparente permet d'estimer la quantité de substrats fluorescents qui a traversé la voie paracellulaire de l'endothélium. Une augmentation de cette perméabilité apparente est le reflet d'une modification de l'intégrité de cette voie au sein de l'endothélium.

En corrélation avec la mesure de la perméabilité apparente, l'évaluation de l'expression des jonctions serrées est nécessaire. En effet, comme décrit précédemment la forte étanchéité est rendue possible grâce à la présence de protéines de jonctions au niveau de la BHE, dont les plus représentatives sont les jonctions serrées, comme les Zonula : ZO-1, et les Claudines : claudin-5 (Naik and Cucullo, 2012). Généralement étudié en western blot, en qPCR ou encore en cell-ELISA, on peut également les observer par imagerie en microscopie confocale, nous avons pris dans nos travaux évaluer l'expression des jonctions serrées de notre modèle en utilisant une technique ELISA sur cellules entières.

De plus, la description de la barrière hématoencéphalique en début de chapitre, nous montre l'importance de la voie transcellulaire, et notamment l'importance des

pompes d'efflux au niveau de la barrière hématoencéphalique. C'est pourquoi, il est important que le modèle *in vitro* mis en place exprime les pompes d'efflux telles que P-gp et BCRP et que celles-ci soient fonctionnelles. Les ABC-transporteurs sont importants pour l'étude de la toxicité et le développement de thérapeutiques médicamenteuses (Helms et al., 2016). On étudie leurs expressions avec les mêmes techniques que pour les jonctions serrées (dans notre travail par la technique de cell-ELISA). Leur fonctionnalité est mesurée par l'évaluation de l'accumulation de substrats spécifiques en présence ou non d'inhibiteurs spécifiques. Chacune des protéines de transport possédant son inhibiteur spécifique, KO-143 pour la protéine BCRP, vérapamil pour la protéine P-gp et probenécide pour la protéine MRP-1. Afin de mesurer l'accumulation avec des inhibiteurs il est nécessaire que ces protéines de transports prennent en charge un substrat, les protéines P-gp et BCRP partagent le même substrat : la rhodamine-123. Les protéines MRP-1 quant à elles, prennent en charge le substrat BCECF-AM. Dans les études d'accumulation, ces substrats sont fluorescents et l'on mesure la fluorescence accumulée à l'intérieur de la cellule en présence ou non d'inhibiteurs. En présence de l'inhibiteur, l'accumulation du substrat devrait être augmentée en comparaison des conditions sans inhibiteur. Dans cette situation, la protéine de transport sera considérée comme fonctionnelle.

Ainsi un modèle de BHE ne pourra être validé que si l'on a en plus d'une bonne étanchéité, validé l'expression des protéines de jonctions serrées et des protéines de transports.

Dans le cadre de la mise en place d'un modèle *in vitro* de BHE de nombreuses questions se posent, notamment sur le choix des cellules, le choix du type de membrane de l'insert et également sur la taille des pores membranaires. Une fois ces différents choix effectués, il est possible de cultiver les modèles sous différentes conformations :

- ✚ **La monoculture**, c'est-à-dire que l'on utilise un seul type de cellules, généralement les cellules endothéliales, que l'on cultive en monocouche sur filtre.
- ✚ **La co-culture**, qui nécessite l'utilisation de deux types cellulaires que nous détaillerons dans le paragraphe 8.1.

✚ **La tri-culture**, qui est la plus complexe des conformations *in vitro* et qui permet d'associer 3 types cellulaires différents, tels que les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes.

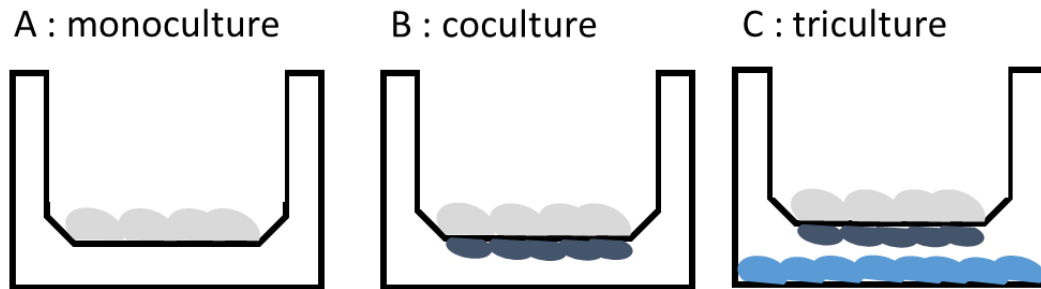


Figure 20 : Représentation schématique des différentes conformations de culture cellulaire sur insert. A. Monoculture B. Coculture C. Triculture. Dans chacun des cas sont représentés en gris clair la monocouche de cellules endothéliales côté luminal et en gris foncé et bleu les autres types cellulaires utilisés (par exemple les astrocytes ou/et les péricytes)

Plus le modèle est complexe, plus on se rapproche des modèles *in vivo* **mais** plus il est difficile de déterminer **l'impact individuel** des différents types cellulaires. De plus afin d'être encore plus proche des conditions physiologiques *in vivo*, il est possible de créer des modèles plus dynamiques, dans lesquels à l'inverse des modèles statiques classiques, on induit un mouvement, par exemple du shear stress au niveau de l'endothélium micro-vasculaire.

Toutes ces caractéristiques sont des questions que l'on doit se poser lorsque l'on souhaite mettre en place des modèles *in vitro* de BHE, afin de répondre au mieux à la question scientifique que l'on se pose. Au cours de cette thèse nous n'avons pas développé de modèle, nous utilisons des modèles déjà mis en place au sein du laboratoire, montrant ainsi leur intérêt mais également leurs reproductibilités avec un expérimentateur différent et une question scientifique différente. Dans les paragraphes 8.1, nous décrivons les caractéristiques spécifiques des deux modèles utilisés dans nos travaux, en adéquation avec les attentes d'un bon modèle *in vitro* de BHE, ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients

8.1 Les modèles *in vitro* de coculture

Les deux modèles utilisés sont des modèles de co-culture, ils sont différents des modèles de monoculture de par la prise en compte des interactions et communications intercellulaires impliqués par l'organisation de la BHE. La monoculture a été développée par Bowman en 1983, avec la mise en place d'une monocouche de cellules endothéliales bovines. L'avantage d'un modèle de monoculture est sa simplicité, il permet de réaliser des études de perméabilité, ainsi que des études sur les ABC-transporteurs (Berezowski et al., 2004). Cependant, ce type de modèle en monoculture limite l'étude de l'intégrité de la BHE car elle ne prend pas en compte la communication intercellulaire avec les péricytes et les astrocytes par exemple. Cette communication implique la mise en place de nouveaux types de modèles *in vitro*, les modèles de coculture.

L'intérêt du modèle de coculture est de se rapprocher plus fidèlement de la barrière hématoencéphalique, en cultivant les cellules endothéliales, qui jouent le rôle principal dans la formation de la BHE, avec un autre type cellulaire connu pour communiquer avec les cellules endothéliales et favoriser l'imperméabilité paracellulaire de l'endothélium cérébral. Comme cité précédemment différents types cellulaires sont amenés à communiquer avec les cellules endothéliales mais dans le cadre de ces travaux c'est la communication entre les astrocytes et les cellules endothéliales qui nous intéressera. A l'heure actuelle, les astrocytes sont ceux qui ont permis la mise en place de nombreux modèles de coculture (Deli et al., 2005; Wilhelm et al., 2011). Comme décrit dans le paragraphe 3 de ce chapitre 2, les astrocytes jouent un rôle important dans le maintien de la fonction de la BHE, dans son étanchéité et dans l'expression et la synthèse des protéines et/ou facteurs de régulation de la BHE (Naik and Cucullo, 2012). Nous avons ainsi mis en place des modèles de co-culture utilisant les astrocytes et les cellules endothéliales.

Dans la littérature 3 modèles différents de co-culture sont retrouvés :

- 🌈 Le modèle de **co-culture en contact** : qui met en relation directe les cellules endothéliales et les astrocytes, en les cultivant de part et d'autres de la membrane poreuse. Les cellules endothéliales sont cultivées sur la face luminal (apical) et les astrocytes sur la face abluminal (basal).

Or, les cellules gliales sont capables de sécréter des facteurs solubles (Wilhelm and Krizbai, 2014), qui induisent l'augmentation de l'étanchéité de l'endothélium. Et c'est ce principe qui a permis le développement de modèle dit « non contact » ou en milieu conditionné (He et al., 2014; Puech et al., 2018a; Rubin et al., 1991).

- ✚ Le modèle de **co-culture en milieu conditionné** : met en relation les cellules endothéliales avec le milieu de culture des astrocytes, préalablement récupéré dans les flasques de maintien de culture. Les cellules endothéliales sont mises en culture du côté luminal sur la membrane de l'insert et le milieu conditionné est déposé dans le puit des plaques compagnons.
- ✚ Le modèle de **co-culture non contact** : met pour sa part en relation indirecte les cellules endothéliales et les astrocytes. Les cellules endothéliales sont cultivées sur la membrane de l'insert, tandis que les astrocytes sont cultivés dans le fond du puits des plaques compagnons.

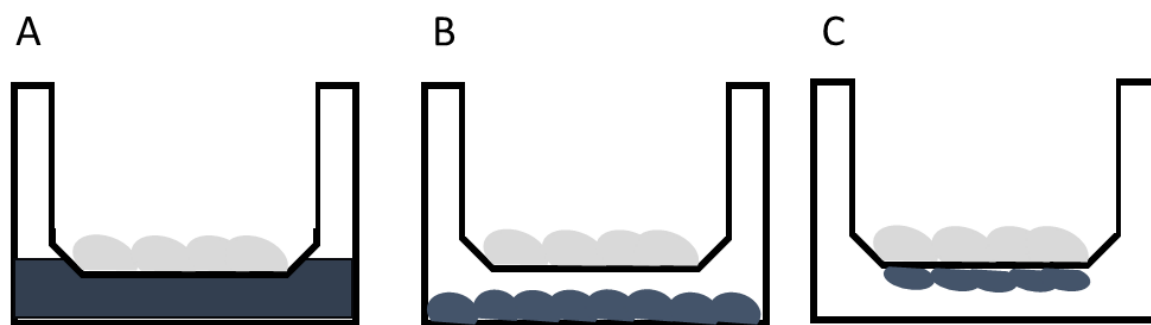


Figure 21 : Représentation schématique des différentes conformations de co-culture. A. Co-culture en milieu conditionné B. Co-culture non contact C. Co-culture en contact. Dans chacun des cas sont représentés en gris clair la monocouche de cellules endothéliales côté luminal et en gris foncé l'autre type cellulaire utilisé (par exemple les astrocytes) ou son milieu dans le cas du A.

Le but de nos travaux de recherche au sein du laboratoire porte sur l'impact d'une pathologie, le SAOS et de ses mécanismes sous-jacents sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de BHE, dans l'objectif final de développer des thérapeutiques médicamenteuses.

Pour cela il est nécessaire de mettre en place un modèle cellulaire représentatif des caractéristiques de la BHE, qui soit stable dans le temps afin de permettre des études sur des temps longs, mais également qu'il soit reproductible avec des expérimentateurs différents et des mécanismes étudiés différents. De plus le modèle développé devra permettre, d'une part l'étude de l'intégrité de l'endothélium, donc avec une étanchéité paracellulaire et des jonctions intercellulaires, et d'autre part l'étude de potentiel médicaments et donc la présence de protéines de transport fonctionnelles.

Le premier modèle mis en place est **un modèle murin de co-culture en contact** entre les astrocytes et les cellules endothéliales, développé dans le but de pouvoir comparer les résultats obtenus à un projet futur de modèle *in vivo* soumis à un stress correspondant à un syndrome d'apnée du sommeil.

Pour la mise en place de ce modèle une lignée immortalisée de cellules endothéliales de souris b.End.3 et d'une lignée cellulaire d'astrocytes de rat (C6 qui est la lignée astrocytaire la plus commune dans les modèles murins (Chatard et al., 2016; Cioni et al., 2012; Hu et al., 2010) ont été utilisées. Les b.End.3 sont souvent utilisées dans la littérature, car elles sont décrites comme possédant les caractéristiques requises pour un bon modèle de BHE (Wuest and Lee, 2012) et notamment leurs caractéristiques paracellulaires (Watanabe et al., 2013). Dans le modèle mis en place, les cellules astrocytaires (C6) ont étéensemencées sur la face abluminale. Une fois que ces cellules astrocytaires ont adhéré les cellules endothéliales sontensemencées sur la face luminale. Le contact entre les cellules, permet aux pieds astrocytaires d'entrer en contact direct avec les cellules endothéliales, favorisant alors l'imperméabilité de la BHE avec une augmentation de la TEER et de la perméabilité. Le contact entre ces cellules a montré une augmentation de la TEER, qui se rapproche de $80\Omega/\text{cm}^2$ et une perméabilité au Na-Fl de l'ordre de $10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ comparé à une monoculture simple (Chatard et al., 2016). De plus il a été montré que ce modèle exprimait des protéines de jonction serrées de type ZO-1, Claudin-5, et des protéines de transport de la famille des ABC, et que ces dernières étaient fonctionnelles (Chatard et al., 2016, 2017). Ce modèle de co-culture en contact répond donc aux caractéristiques requises pour être un bon modèle d'étude : l'expression de jonctions importantes dans le fonctionnement de la BHE (Naik and Cucullo, 2012), mais

également l'expression d'ABC-transporteurs fonctionnels (Dombrowski et al., 2001; Schinkel, 2001).

Ce modèle répond aux critères attendus pour un modèle de BHE, TEER d'environ $100\Omega/\text{cm}^2$ (Naik and Cucullo, 2012) et une perméabilité de l'ordre de $10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (Wilhelm and Krizbai, 2014), ainsi que l'expression des protéines d'intérêts. Ce modèle est facile à mettre en place, rapide avec l'obtention du modèle en 8 jours. Cependant il possède ses limites. En effet ce modèle ne prend en considération que la communication entre les cellules endothéliales et les astrocytes, mais pas l'impact des péricytes, qui ont été montré comme jouant un rôle dans le maintien de l'homéostasie (Vandenhoute et al., 2011). Ce modèle est un modèle statique, qui ne prend pas en compte la force de cisaillement entraînée par le flux sanguin dans les vaisseaux, autrement appelée shear stress, qui a été décrit pour son rôle dans l'induction et le maintien des caractéristiques de la barrière hématoencéphalique (Prabhakarparndian et al., 2013). Néanmoins ce modèle peut être utilisé comme un modèle d'étude de pathologies et de leur impact sur l'intégrité de la barrière, car il exprime les protéines d'intérêts et reflète les caractéristiques d'un bon modèle de BHE. Cependant il est recommandé de valider par la suite les résultats avec des cellules humaines et des modèles *in vivo* car il existe des différences entre les espèces malgré une homologie importante (He et al., 2014).

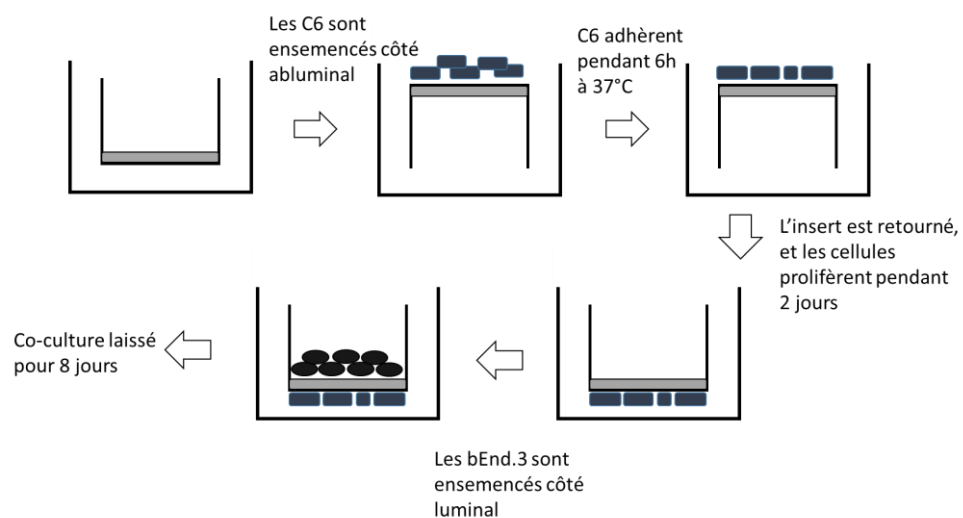


Figure 22 : Illustration schématique de la mise en place du modèle *in vitro* de co-culture en contact d'une BHE murine.

Le deuxième modèle utilisé dans ces travaux est **un modèle de co-culture en milieu conditionné humain**. Ils reposent sur le fait que les cellules gliales sont capables de sécréter des facteurs solubles (Wilhelm and Krizbai, 2014), qui induisent l'augmentation de l'étanchéité de l'endothélium. Comme le modèle précédent, il est nécessaire que ce modèle réponde à des critères définis : il doit être cultivé sur une membrane poreuse, afin de mimer les compartiments cérébraux et vasculaires. Sa perméabilité doit être faible de l'ordre de $10^{-6}\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ vis-à-vis d'un composé hydrophile de petite taille, tels que le sodium-fluorescéine : Na-Fl. Il doit exprimer des protéines de jonctions serrées et des protéines de pompe d'efflux doivent être présentes. Pour ce modèle de co-culture en milieu conditionné, les cellules endothéliales, Hbec5i (Human Brain Endothelial Cell) qui est une lignée immortalisée, forme avec la lignée cellulaire d'astrocyte HA (Human Astrocyte) le modèle de BHE. Les cellules endothéliales sont mises en culture sur la membrane poreuse face luminale, et dans le puit face abluminale le milieu astrocytaire est ajouté. Ce milieu astrocytaire, dit milieu conditionné, est un milieu qui a été placé pendant au moins 48h en contact avec les cellules astrocytaires, ce qui est le temps considéré comme nécessaire pour la sécrétion des facteurs solubles impliqués dans l'induction de la barrière (Puech et al., 2018b). Dans ce modèle, comme dans le modèle murin, les caractéristiques nécessaires pour la conformité d'un bon modèle *in vitro* ont été évaluées et validées. Ce modèle exprime des protéines de jonctions serrées et des ABC-transporteurs fonctionnels, la mesure de perméabilité est en accord avec la littérature soit environ $40\Omega/\text{cm}^2$. Ce modèle a fait l'objet d'un article confirmant qu'il respecte les caractéristiques requises par Puech et al en 2018 (Puech et al., 2018b).

Ce modèle possède l'avantage d'être stable pendant plusieurs jours (environ 4 jours), ce qui permet d'évaluer l'effet de molécules d'intérêt pendant un temps d'exposition plus long. C'est un modèle qui permet des études pharmacologiques et qui répond aux attentes d'une barrière hématoencéphalique, avec une augmentation de la fonctionnalité des ABC-transporteurs en présence du milieu astrocytaire, ce qui reflète l'importance des astrocytes dans les modèles (Berezowski et al., 2012). Cependant bien que ce modèle se rapproche de la physiologie, nous ne pouvons étudier que l'impact sur l'endothélium cérébral, or comme pour le modèle décrit précédemment, la BHE est une organisation complexe entre différents types de cellules, qui interagissent les unes avec les autres.

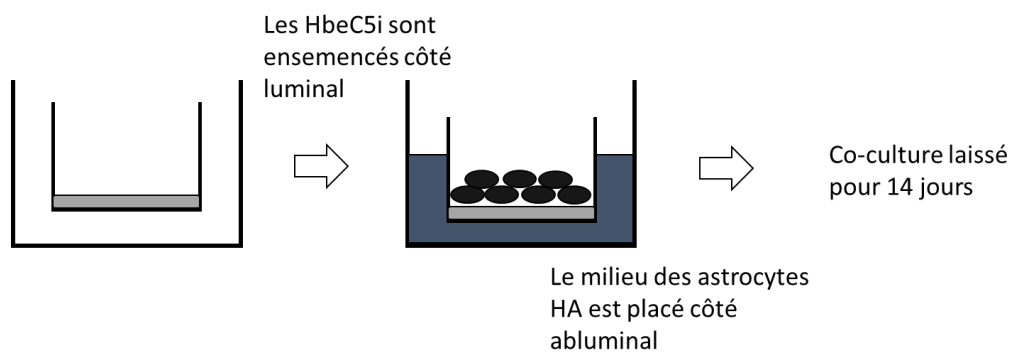


Figure 23 : Illustration schématique du modèle *in vitro* de coculture en milieu conditionné de BHE humaine.

Il est donc possible de complexifier ces deux modèles que ce soit avec de la triculture en ajoutant les péricytes, qui jouent eux aussi un rôle important dans la formation et le maintien de la BHE, soit en mettant directement en contact les astrocytes humains et leurs cellules endothéliales (Al Ahmad et al., 2011). On peut également intégrer du shear stress. Cependant ces deux modèles se sont montrés conformes aux attentes d'un bon modèle *in vitro* de BHE, avec une perméabilité apparente de l'ordre de 10^{-6}cm.s^{-1} , et la présence des protéines d'intérêts. De plus avec ces travaux de thèse, nous mettons en avant un point essentiel pour un modèle, la reproductibilité. Nous montrons grâce à cette thèse que ces deux modèles peuvent être utilisés par un expérimentateur différent dans un contexte de recherche différent, tous en confirmant leur bonne conformité face aux attentes d'un bon modèle d'étude *in vitro* de la BHE.

L'unité neurovasculaire est donc une unité multicellulaire, qui représente les communications intercellulaires dans le contexte de la barrière hématoencéphalique. Celle-ci étant considérée comme l'une des principales structures protectrices du SNC, son étude est importante dans le cadre physiologique et/ou pathologique. Nous montrons dans ce chapitre que des modèles *in vitro* de BHE peuvent être mis en place selon différentes conformations afin d'étudier les mécanismes impliqués dans certaines pathologies. Or dans une situation pathologique telle que le syndrome d'apnée obstructive du sommeil, des mécanismes patho-physiologiques passant par la

libération de biomarqueurs spécifiques peuvent influencer les caractéristiques physiologiques de la BHE. Ce sont ces différents biomarqueurs que nous allons décrire dans le chapitre 3.

Chapitre 3 : Mécanismes impliqués dans le SAOS et la barrière hématoencéphalique

Nous avons décrit la barrière hématoencéphalique comme l'un des premiers systèmes de défense de l'être humain et du SNC, ce qui rend son étude en condition pathologique importante. Il est à ce stade nécessaire de compléter les informations déjà acquises sur sa dérégulation et sur son rôle dans les risques neurovasculaires et neurocognitifs associés à de nombreuses pathologies. Ces risques neuronaux sont retrouvés dans le cadre du syndrome d'apnée obstructive du sommeil, qui est l'une des thématiques centrales du laboratoire SNA-EPIS.

Le syndrome d'apnée du sommeil est défini comme la répétition de micro-arrêts respiratoires au cours du sommeil, engendrant une diminution de l'apport en oxygène c'est-à-dire une hypoxie, mais également des micro-éveils c'est-à-dire une fragmentation du sommeil. Ces deux conséquences physiopathologiques entraînent des complications cardiovasculaires et cérébrovasculaires, associant alors le SAOS avec une augmentation des risques d'infarctus, d'accidents vasculaires cérébraux, ou encore de diabète. Ces conséquences « directes » combinées aux complications associées au SAOS, influencent la réponse inflammatoire de notre organisme.

Dans ce chapitre nous nous intéresserons à l'influence de cette hypoxie intermittente, qui est l'une des conséquences « directes » du SAOS. Mais également aux conséquences de l'inflammation, conséquences « indirectes » du SAOS sur le système nerveux central et en particulier de leurs actions connues au niveau de l'intégrité de l'endothélium cérébral de la BHE.

1. L'hypoxie intermittente et la BHE

Tout d'abord afin de pouvoir étudier les conséquences d'une hypoxie, qu'elle soit aiguë ou intermittente, il est nécessaire d'utiliser et/ou de développer des méthodes d'induction de cette voie, notamment en induisant l'activation de la voie HIF-1, qui est la principale voie de l'hypoxie décrite dans le chapitre 1.

A l'heure actuelle, différentes méthodes sur des modèles *in vitro* ont déjà été développées et utilisées dans le but d'évaluer l'impact cellulaire et/ou moléculaire d'une hypoxie cellulaire. Au cours de nos travaux, les deux méthodes décrites ci-dessous nous ont particulièrement intéressées, chacune permettant à sa façon d'intervenir sur la voie HIF-1.

Tout d'abord l'induction grâce aux **ENCEINTES HERMETIQUES**, ou hypoxie physique : c'est l'une des méthodes les plus utilisées que ce soit en *in vivo* ou *in vitro*. Elle permet l'induction d'une hypoxie en faisant varier les pressions partielles en oxygène et dioxyde de carbone. Pour cela, les systèmes d'enceintes sont reliés à des réserves de gaz calibrées, permettant la variation des pressions partielles. Ces gaz sont l'oxygène, le dioxyde de carbone, et l'azote qui permette de réguler les taux à l'intérieur de l'enceinte hermétique. L'avantage de ces enceintes est qu'elles permettent un contrôle efficace des pourcentages du mélange gazeux, de l'humidité et de la température à l'intérieur de l'enceinte. Ces paramètres sont majeurs en culture cellulaire. Cependant ces dispositifs sont coûteux et la possibilité de faire des cycles hypoxiques courts restent limitée et nécessite des adaptations de l'expérimentateur. Depuis les années 2000, des études utilisant ce type de dispositif émergent, des études sur des cellules endothéliales bovines soumises à une hypoxie aigue de 24h grâce à une enceinte (Fischer et al., 2000), afin de maintenir une fraction d'oxygène de 2%, en modifiant la concentration d'azote (93%) et de dioxyde de carbone (5%). D'autres études sur des modèles *in vitro* de tri-culture ou monoculture de barrière hématoencéphalique, soumise à 1% de fraction d'oxygène durant 48h ont montré des altérations de la barrière hématoencéphalique (Al Ahmad et al., 2011; Engelhardt et al., 2014). D'autres études encore sur des modèles murins de BHE soumis à une hypoxie cyclique en oxygène de 1% pendant 15 secondes et 21 % durant 3min (Adhikary et al., 2001) ou à 5% durant 35 minutes et 21% durant 25 minutes (Gozal et al., 2005), montrent des modifications structurales de la BHE, mais démontrent également les grandes possibilités de création de cycle grâce à ces enceintes. Cependant les enceintes nécessitent un temps d'adaptation long pour passer de 1-5% à 21% qui doit être pris en compte. Bien que ce dispositif soit très utilisé pour des études d'hypoxie aigue, ce dispositif reste très complexe pour induire une hypoxie intermittente chronique (répétée), c'est pourquoi d'autres méthodes d'induction ont été développées.

L'induction **PAR AGENTS CHIMIQUES**, fait partie de ces méthodes. Cette méthode d'induction est principalement liée à l'inhibition de certains participants à la voie de l'hypoxie HIF-1 et notamment de l'enzyme PHD. En inhibant cette enzyme on empêche la dégradation de la sous-unité α de HIF-1, qui pourra alors former son hétérodimère avec HIF-1 β . Cette inhibition permet de créer artificiellement un environnement hypoxique. C'est une bonne méthode alternative pour améliorer les connaissances sur l'effet de l'hypoxie sur des modèles *in vitro*. Les agents chimiques les plus utilisés sont le chlorure de cobalt, le déferoxamine, mais également l'hydralazine, qui ont des effets cellulaires assez similaires à l'hypoxie physique (Chatard et al., 2017; Engelhardt et al., 2014). Cependant le chlorure de cobalt montre une cytotoxicité non négligeable ce qui limite son utilisation (Cervellati et al., 2014), c'est la raison qui nous a amené à nous intéresser à un autre agent chimique, l'hydralazine. L'hydralazine est un vasodilatateur utilisé anciennement en clinique qui agit en inhibant l'enzyme PHD, ce qui permet le passage de HIF-1 α dans le noyau (Knowles et al., 2004). L'induction chimique n'induit pas de changement de pression partielle, ce qui limite l'interprétation de ces résultats. Cependant, cette méthode reste néanmoins une méthode très contrôlable et reproductible. De plus son effet sur la voie hypoxique HIF-1 est réversible après quelques heures, ce qui permet d'envisager de mimer une hypoxie intermittente qui alterne des cycles « longs » hypoxiques et normoxiques (Chatard, 2017; Chatard et al., 2016) .

Ces deux méthodes d'inductions de l'hypoxie agissent par l'intermédiaire de la voie HIF-1. Cette voie de signalisation hypoxique peut faire l'objet de méthodes d'inhibition. Ces inhibitions sont dépendantes d'agents chimiques, qui peuvent être de différents types tels que le 2Me2 (méthoxyestradiol), ou encore l'YC-1 (3-(5'-hydroxyethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole). Ces différents agents chimiques inhibent l'expression et/ou l'activité de HIF-1 α (Engelhardt et al., 2014; Melillo, 2007; Yeh et al., 2007).

La molécule YC-1 est l'agent chimique qui nous intéressera dans ces travaux. Il agit en inhibant la dégradation de HIF-1 α par le protéasome, ce qui permet la dimérisation de ce dernier avec HIF-1 β et donc favorise son action sur les gènes cibles.

L'inconvénient de cet inhibiteur est qu'il semble être impliqué dans d'autres voies biologiques, et serait donc un inhibiteur non sélectif de la voie HIF-1 α .

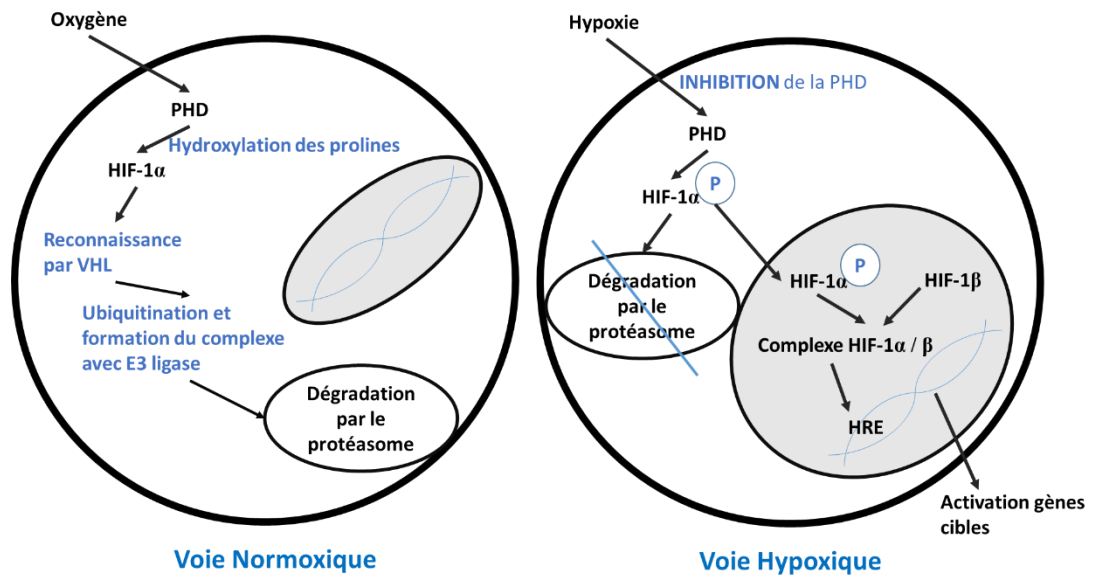


Figure 24 : Illustration schématique de la voie HIF-1 que ce soit en normoxie ou en hypoxie. En condition de normoxie, grâce à la détection d'oxygène l'enzyme PHD va venir hydroxyler la sous-unité α , ce qui va conduire à la formation d'un complexe HIF-1 α -VHL-E3 qui sera dégradé par le protéasome. En présence d'YC-1 (hypoxie) la PHD ne joue plus son rôle il y a donc pénétration de la sous-unité α dans le noyau, où elle formera un complexe avec HIF-1 β . Ce complexe va activer des éléments de réponses HRE qui vont alors activer les gènes cibles.

Les études concernant l'hypoxie intermittente et son inhibition sont peu nombreuses sur des modèles *in vitro* de BHE. Cette barrière étant l'une des cibles potentielles pour expliquer les conséquences neurocognitives des patients atteints de SAOS (Lim and Pack, 2014). Cette hypothèse pourrait se confirmer par des études en imagerie volumique montrant une hypertrophie et une hypotrophie de certaines régions proches de l'hippocampe, cette hypotrophie étant possiblement liée à une perte cellulaire et donc à une lésion du tissu cérébral (Palomares et al., 2015). Xia Dong et al. se sont intéressés à l'effet de ce type de stress hypoxique sur un modèle de cellules endothéliales cérébrales de rat. Ils montrent qu'après 8 jours d'hypoxie intermittente l'expression de protéines telles que P-gp est augmentée, ce qui pourrait expliquer la pharmacorésistance observée dans ce contexte (Xiao-Dong et al., 2008). Des résultats

similaires sur l'augmentation de l'expression des pompes d'efflux ont été observés sur d'autres modèles *in vitro* de BHE (Phillips et al., 2004), dont un modèle de co-culture entre astrocyte et les cellules endothéliales soumis à une hypoxie induite par un agent chimique (Chatard et al., 2016). Au niveau de l'intégrité paracellulaire, c'est-à-dire de la perméabilité et l'expression des protéines de jonctions serrées, Chatard et al. a également montré qu'une hypoxie intermittente induite par agent chimique, entraîne une diminution de l'expression des jonctions serrées tels que ZO1 et claudine-5 (Chatard et al., 2016). Ces résultats ont été également observé dans des études portant sur des pathologies associées à un dysfonctionnement axonal et des modifications des capacités cognitives (Kim et al., 2015), assez similaires à celles observées dans le SAOS.

Ces résultats tendent à montrer que l'activation des gènes cibles par le dimère HIF-1 α/β entrainerait l'altération des voies paracellulaires et régulerait l'activité de la voie transcellulaire, impactant aussi le système nerveux central, pouvant expliquer une certaine pharmacorésistance. Or dans le cadre du SAOS, de nombreuses recherches portent sur l'amélioration et/ou la découverte de nouveaux traitements pharmacologiques permettant de limiter les conséquences de ce SAOS. Dans cette perspective, des études qui consistent à inhiber la voie HIF-1 sont menées. En 2007, Yeh et al. ont montré que l'utilisation de YC-1 comme inhibiteur, prévient l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium de rat après une hypoxie aigüe (Yeh et al., 2007). Par la suite Engelhardt et al. ont confirmé ces résultats en comparant l'YC-1 et le 2Me2 suite à une hypoxie aigüe. Ainsi après l'utilisation de ces inhibiteurs, ils observent une délocalisation de ZO-1 et de Claudine-5 (Engelhardt et al., 2014). L'inhibition de la voie hypoxique par des agents chimiques, préviendrait donc potentiellement l'altération de la barrière hématoencéphalique (Yang et al., 2015).

Ces études suggèrent une prévention liée à une inhibition de la voie hypoxique sur l'intégrité de la BHE, ce qui est un point intéressant pour la mise en place de thérapies. Elles mettent également en évidence que l'hypoxie intermittente et notamment l'activation de la voie HIF-1 α a une part importante dans la dérégulation endothéliale. Des mécanismes et/ou voies différentes semblent intervenir en faveur de cette dérégulation de l'endothélium cérébral comme par exemple la réponse

inflammatoire (cf le chapitre 1), qui est une conséquence indirecte mais importante au cours d'un SAOS, avec notamment des concentrations sanguines élevées en CRP ou en cytokines proinflammatoires chez des patients atteints d'un SAOS.

2. L'inflammation et la BHE

Le lit vasculaire, où se situent les cellules endothéliales, a un rôle inducteur sur l'endothélium et sa fonction (Hawkins and Davis, 2005). En comparaison avec l'endothélium périphérique, l'endothélium cérébral semble plus résistant aux médiateurs de l'inflammation (Hickey, 2001). Cette résistance a été attribuée aux caractéristiques paracellulaires, c'est-à-dire la restriction du passage à travers le vaisseau cérébral de la BHE. L'inflammation de l'endothélium cérébral peut prendre diverses origines (Abbott, 2000). L'altération ou le déséquilibre locale en cytokines, une infection virale, l'action des radicaux libres peuvent activer l'endothélium du tissu cérébral et par conséquent altérer les fonctions cellulaires. La source principale des agents inflammatoires provient des cellules appartenant à l'unité neurovasculaire, se situant au voisinage de l'endothélium (Minagar and Alexander, 2003). De nombreuses preuves montrent que les médiateurs inflammatoires ne sont pas uniquement liés aux lésions du tissu cérébral.

La libération des cytokines proinflammatoires perturbent la structure de la BHE et dérégulent l'expression des protéines de transports. Ceci pourrait être associé à des troubles neurocognitifs ultérieurs (Tuttolomondo et al., 2008). Des études *in vivo* montrent par exemple que l'injection de médiateurs inflammatoires dans les pattes arrières de rongeur vont augmenter le passage du sucrose au niveau de la BHE, influençant ainsi la perméabilité de cette barrière (Huber et al., 2001). D'autres études montrent le lien entre la diminution de l'expression de ZO-1 et occludine au niveau membranaire et la diminution de leur association avec le cytosquelette d'actine (Huber et al., 2002). Des observations similaires démontrent que l'initiation de l'inflammation induit, sur l'intégrité de la BHE, un déclin associé à la perte de fonction de cette barrière (Megyeri et al., 1992). Cette ouverture est une fenêtre pour la pénétration des cellules leucocytaires mais aussi des substances potentiellement néfastes pour le cerveau, qui représenteront des signaux de certaines voies de transduction induisant des dommages supplémentaires (Kim et al., 1992). De nombreuses explications ont été présentées, afin d'expliquer l'apparition d'un stade inflammatoire de cette barrière

incluant la rupture naturelle de la BHE dans l'ischémie, la sclérose en plaque ou encore la maladie d'Alzheimer (Petty and Lo, 2002). L'inflammation peut entraîner des dommages endothéliaux avec une modification de l'apoptose et du fonctionnement mitochondrial (Cardoso et al., 2012), mais aussi de l'organisation des jonctions serrées. Des modifications non disruptives avec une régulation des ABC-transporteurs sont également possibles (Hartz et al., 2006). De nombreux systèmes de transport ont été identifiés pour participer au passage des cytokines à travers la BHE (Banks, 2005). La BHE offre des sites aux récepteurs des cytokines qui peuvent soit altérer la fonction intracellulaire, soit le passage de cytokines à travers la BHE (Ericsson et al., 1995; Nadeau and Rivest, 1999; Osburg et al., 2002). L'influence du TNF- α et de l'IL-6, qui sont les principaux médiateurs proinflammatoires connus pour être impliqués dans une possible rupture de l'intégrité neurovasculaire (Rochfort and Cummins, 2015; Rochfort et al., 2016), a été décrite au cours de nombreuses pathologies telles que le SAOS. De plus l'IL-17 connue pour son influence sur la BHE (Huppert et al., 2009; Kebir et al., 2007) et retrouvée augmentée dans le sérum du SAOS de forme pédiatrique (Anderson et al., 2014; Huang et al., 2016). Nous nous sommes donc principalement intéressés à leurs impacts respectifs au niveau du système nerveux central et de la BHE.

2.1 Le TNF- α

La fonction biologique du TNF- α dans le système nerveux central n'est considérée que depuis 1987, quand Frei-Sirpl et al ont découvert que la microglie produisait du TNF- α (Frei et al., 1987). Depuis, il a été démontré que d'autres populations cellulaires du SNC en synthétisent et libèrent sous forme soluble et transmembranaire, aussi bien des astrocytes, que des neurones (Kogo et al., 2006; Lieberman et al., 1989). La signalisation du TNF- α joue différents rôles au niveau du SNC (Tansey and Wyss-Coray, 2008). Il peut notamment activer des populations microgliales, astrocytaires, et être associé à la destruction astrocytaire (Asgari et al., 2015). Le TNF- α intervient également dans la régulation de la perméabilité de la BHE avec une diminution de l'expression des jonctions serrées (Daniels et al., 2014). Il aurait également un rôle dans la régulation des systèmes d'ABC-transport avec une diminution de l'expression de P-gp (Hartz et al., 2006), ou encore une augmentation des récepteurs qui intervient dans la transcytose (Osburg et al., 2002).

De plus, comme pour la plupart des médiateurs inflammatoires, les déséquilibres dans les taux de ce médiateur au niveau de l'environnement extracellulaire entraînent des dysfonctionnements locaux. Une augmentation de l'expression du TNF- α est rapportée dans un certain nombre de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, où l'on retrouve une augmentation du taux de TNF dans le liquide céphalorachidien (Nagatsu et al., 2000), ou encore dans la maladie d'Alzheimer, avec un taux sérique en TNF- α plus important (Diniz et al., 2010; Perry et al., 2001).

De plus, dans le cadre du syndrome d'apnée obstructive du sommeil, le niveau sérique de TNF- α est augmenté (Nadeem et al., 2013). En effet, il a été montré, d'une part, que la fragmentation du sommeil induit une augmentation du taux de TNF- α circulant dans le sang (Kaushal et al., 2012). Et d'autre part, des études sur l'hypoxie intermittente impliquent également les voies inflammatoires, avec au niveau cellulaire et extracellulaire, une augmentation du taux TNF- α , permettant de donner plus d'impact encore à l'hypothèse d'une inflammation chronique systémique de bas grade dans un SAOS (Dyugovskaya et al., 2011; Nâcher et al., 2009; Strohl, 1996).

Au niveau de l'endothélium cérébral, il a été montré que le TNF- α , entraîne une augmentation de la perméabilité paracellulaire, corrélée à une diminution de l'expression de ZO-1 et d'une modification de son association avec l'occludine (Rochfort and Cummins, 2015; de Vries et al., 1996). D'autres études qui portent sur les modifications des pompes d'efflux, ont montré qu'après un stress proinflammatoire court, c'est-à-dire après 6h d'exposition au TNF- α , l'expression de la protéine P-gp (de la famille des ABC-transporteurs) est diminuée, tandis qu'une exposition plus longue au TNF- α aura l'effet inverse (Hartz et al., 2006; Hawkins et al., 2010).

2.2 L'IL-6

Etant donné le nombre et la diversité des cellules dans lesquelles l'IL6, est retrouvée, son importance dans le SNC est grande. De nombreux travaux sur l'IL-6 l'identifient comme un médiateur impliqué dans de nombreuses pathologies inflammatoires, auto-immunes et dégénératives (Van Wagoner and Benveniste, 1999). Les cellules gliales et endothéliales sont capables de produire de l'IL-6 (Suzuki et al., 2009). De nombreux agents issus de différentes voies de signalisation, comme le

facteur NFκB vont entraîner une augmentation de la production d'IL-6 dans le SNC (Van Wagoner and Benveniste, 1999). Nadeem et al. ont montré une augmentation du taux sérique d'IL-6 chez des patients atteints d'un SAOS. Ceci est également retrouvé pour différents biomarqueurs comme la CRP, l'interleukine-8 (Nadeem et al., 2013; Zhong et al., 2016). De plus la réactivité d'un type de cellule donné à l'IL-6 est corrélée au niveau locaux des ligands-récepteurs, et l'élévation du taux de sIL-6R a été observé dans de nombreuses pathologies cérébro-vasculaires. Le sIL-6R est impliqué dans différents processus physiopathologiques, ce qui est important pour les cellules endothéliales qui manquent de t IL6R (März et al., 1999).

Au niveau des cellules endothéliales cérébrales, l'IL-6 a un effet néfaste et favorise la réponse inflammatoire prolongée. Nadeau et al. en 1999, montrent ainsi que les cellules endothéliales possèdent des récepteurs pour le TNF-α, et l'IL-6 et leurs présences entraînent la rupture de la BHE (Nadeau and Rivest, 1999). Il a été montré que l'IL-6 augmente la perméabilité et induit l'angiogenèse via une libération importante de VEGF (Nakahara et al., 2003), mais elle peut également induire la synthèse de molécule d'adhésion et de chimiokines tels que l'IL-8 (Prudhomme et al., 1996; Romano et al., 1997), qui sont des facteurs qui favorisent la pénétration leucocytaire et le maintien de l'inflammation cérébrale (Huang et al., 2006). Des déficiences endothéliales ont été observées en lien avec l'IL-6 et dépendant de NFκB (Brasier, 2010). L'importante production de l'IL-6 au niveau du SNC en fait un élément important dans la progression des maladies du SNC. Il a été montré que lors d'une hypoxie intermittente on observe une induction de la production d'IL-6 (Schaefer et al., 2017). Des études sur des modèles *in vitro* de BHE montrent une augmentation de la perméabilité paracellulaire en association avec la modification de l'expression de ZO-1, au même titre que pour le TNF-α (Rochfort and Cummins, 2015), ainsi qu'un changement au niveau des pompes d'efflux. Il semblerait qu'un traitement à l'IL-6 diminuerait l'expression de transporteurs tels que P-gp après 6h de stress inflammatoire (Poller et al., 2010).

2.3 L'IL-17

Si l'on surexprime l'IL-17A dans les cellules astrocytaires du SNC, on active les cellules gliales et on améliore la réponse neuro-inflammatoire. Les cellules du SNC expriment les récepteurs IL-17RA et l'IL-17RC, qui forment le complexe fonctionnel de cette cytokine (Zimmermann et al., 2013). La surexpression d'IL-17A aurait un effet plus modéré que la surexpression d'IL-6 (Campbell et al., 1993). Les injections d'IL-17 dans le compartiment cérébral semblent associées à la perte de l'intégrité de la BHE, lié à l'inflammation du tissu cérébral et à l'augmentation du taux sérique de médiateurs inflammatoires dans la circulation. Cependant l'implication de l'IL-17 a été peu décrite. Huppert et al. ont montré que l'IL-17 modifie la perméabilité de la BHE avec un changement de distribution de ZO-1 et de Claudin-5 (Huppert et al., 2009), tandis que d'autres études montrent dans cette condition une diminution de l'expression de ces mêmes protéines de jonctions serrées (Kebir et al., 2007). Les LTh17 sont également capables de favoriser la production de protéines métalloprotéase (MMP), qui induisent une destruction matricielle, impliquant secondairement une destruction de la BHE (Chabaud et al., 1999; Miossec and Kolls, 2012). En plus de stimuler la production de cytokines telles que l'IL-6, un traitement avec de l'IL-17 augmente l'impact du TNF- α , tout comme le TNF- α peut permettre d'augmenter les effets de l'IL-17 lorsqu'ils sont associés (Amatya et al., 2017; Nichols et al., 2009), suggérant que le rôle principal de l'IL-17 dans le maintien du stade inflammatoire du SNC est de s'associer aux autres cytokines proinflammatoires, et d'être un médiateur de leurs sécrétions (Nichols et al., 2009).

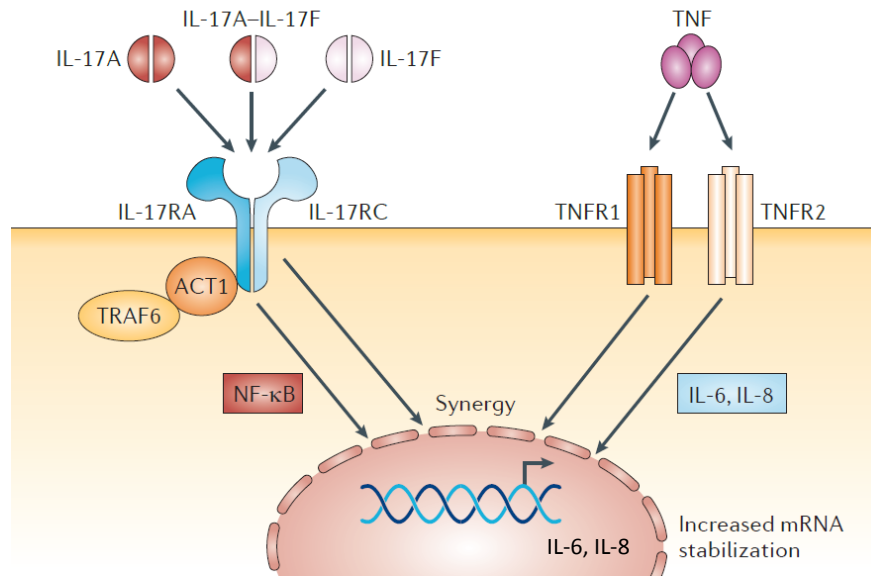


Figure 25 : Structure de l'IL-17 et de son interaction avec ses récepteurs IL-17 RA et RC, ainsi que son action synergique avec le TNF- α sur la production d'IL-6 d'après Miossec et al. (Miossec and Kolls, 2012). L'IL17A et l'IL-17F peuvent former des homo- ou hétérodimère, qui se lient au complexe du récepteur (IL-17RA-IL-17RC). La signalisation induit l'activation de la fonction de différentes voies dont NF κ B. Mais également l'activation du TRAF6 qui induit augmente la transcription des gènes de l'IL-6. Action synergique à celle produite quand le TNF se lie à ses récepteurs TNFR1 et TNFR2.

Dans le contexte du syndrome d'apnée obstructive du sommeil, la revue de Nadeem et al. montre que les taux sériques de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6, le TNF- α ou encore la CRP à haute sensibilité sont nettement augmentés. Et que cette augmentation est proportionnelle à la sévérité du syndrome (Nadeem et al., 2013). Il existerait alors au niveau sérique, une composition en biomarqueurs diverses qui pourraient jouer un rôle sur la dérégulation de l'endothélium microvasculaire cérébrale.

2.4 Le facteur nucléaire κ B (NF- κ B)

La présence dans le syndrome d'apnée du sommeil, de cytokines proinflammatoires mais également d'un possible stress oxydant, associé à l'hypoxie intermittente, pourrait induire une activation du facteur transcriptionnel NF- κ B (Htoo et al., 2006).

Découvert en 1986, le facteur NF- κ B est un complexe dimérique appartenant à la famille Rel. Il est caractérisé par un domaine N-terminal : le domaine d'homologie Rel, responsable de la liaison avec l'ADN, de la localisation nucléaire ainsi que de sa dimérisation. Ces protéines sont subdivisées en deux groupes, le premier regroupe des protéines qui sont synthétisées sous forme de précurseurs cytoplasmiques, qui donneront les protéines NF- κ B1 (ou p50), NF- κ B2 (ou p52), après leur clivage, et qui ne peuvent pas activer à lui seul la transcription. Le deuxième groupe se compose des protéines RelA (ou p65), RelB et c-Rel, qui ne sont pas synthétisées sous forme de précurseurs et qui possèdent un ou deux domaines d'activation de la transcription (Grimm and Baeuerle, 1993). Une protéine de chaque groupe forme donc un dimère, qui sera séquestré dans le cytoplasme grâce à une protéine de la famille d'I κ B, dont chaque membre exerce une fonction qui lui est propre.

Lorsque l'un des signaux (cytokines proinflammatoires, stress oxydant, ...) est déclenché, cela entraîne une phosphorylation de la protéine I κ B, suivie d'une ubiquitination et d'une dégradation protéosomique de cet inhibiteur d'activité de NF- κ B. L'autre méthode alternative, implique une phosphorylation d'autres résidus de l'I κ B entraînant une dissociation avec le complexe NF- κ B. Une fois libéré de l'I κ B, le NF- κ B est libre de migrer dans le noyau, contrôlant ainsi l'expression d'un grand nombre de gènes dont les fonctions sont variées, dont les gènes de médiateurs de la réponse immunitaire (Denk et al., 2001; Kempe et al., 2005). NF- κ B joue donc un rôle essentiel dans la réponse immunitaire et l'amplification du phénomène inflammatoire.

Cependant il est à noter qu'il existe un mécanisme de rétrocontrôle limitant l'activité du NF- κ B, en entraînant la synthèse de son inhibiteur cytoplasmique I κ B. Ceci permet à ce dernier de séquestrer à nouveau le NF- κ B dans le cytoplasme.

Dans ce chapitre nous montrons que les cytokines proinflammatoires et la voie HIF-1 impliquent des biomarqueurs spécifiques associés à des mécanismes d'activation particuliers, tels que l'activation de la voie NF- κ B retrouvés lors d'un SAOS (Williams and Scharf, 2007). Chaque médiateur, de par son activité individuelle, influence l'homéostasie cérébrale. Cependant à travers leurs évaluations fonctionnelles individuelles, il est considéré que leurs effets ne peuvent pas être

synergiques et un biais d'évaluation subsiste. De plus, seules ces deux voies sécrèteraient des biomarqueurs sériques. Néanmoins, bien que leurs interventions dans le SAOS soient claires, il est nécessaire de considérer que d'autres biomarqueurs sanguins peuvent également modifier l'homéostasie locale. Il s'agit notamment de ceux liés aux pathologies associées, telles que l'insuline, les triglycérides, ou encore l'acide urique, qui peuvent se retrouver en quantité non négligeable dans le sérum de ces patients, pouvant également influencer l'intégrité de la BHE.

C'est pourquoi l'utilisation de sérum issu de cohortes, tels que la cohorte PROOF, semble être une bonne approche pour défricher les influences synergiques d'un syndrome comme le SAOS, sur des modèles *in vitro* de barrière hématoencéphalique.

Conclusion de la revue bibliographique

Au niveau du SNC, nous retrouvons des structures spécifiques et nécessaires à son fonctionnement, telles que la barrière hématoencéphalique. L'endothélium de cette barrière est caractérisé par différentes voies de passage entre sang et cerveau, d'une part, le passage paracellulaire, avec la présence de jonctions serrées. Et d'autre part la voie transcellulaire associée à la présence de systèmes de transport, tels que les transports par transcytose, ou encore les enzymes de dégradation mais surtout grâce à la présence de pompes d'efflux. Cet endothélium est responsable du maintien de l'homéostasie cérébrale et donc de la protection du SNC. Ce maintien est permis par l'influence de son environnement sur ces caractéristiques spécifiques, et notamment les interactions et communications intercellulaires. L'ensemble de cet environnement multicellulaire représente ce que l'on appelle l'unité neurovasculaire. Malheureusement, la complexité de cette unité rend son étude *in vivo* difficile. De ce fait, ces dernières années se sont développés des modèles de BHE *in vitro* tels que ceux décrits dans cette revue bibliographique, qui permettent notamment de maintenir la communication entre les différents types cellulaires de l'UNV, induisant une étanchéité de l'endothélium cérébral plus importante. Afin de pouvoir évaluer des altérations de l'endothélium de ces modèles de BHE, il est nécessaire qu'ils développent certaines caractéristiques fondamentales de la BHE. Les caractéristiques principales étant : une faible perméabilité, une résistance électrique transendothéliale importante (TEER), mais également qu'ils expriment des protéines de jonctions serrées et des protéines pompes d'efflux tels que les ABC-transporteurs.

Ces modèles sont régulièrement utilisés dans l'étude des mécanismes physiopathologiques cérébrovasculaires sous-jacents à de nombreuses pathologies. Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil, qui entraîne une hypoxie intermittente chronique et une fragmentation du sommeil, est étroitement lié à des conséquences cérébrovasculaires. L'inflammation persistante peut être associée d'une part à l'hypoxie répétée, mais d'autre part à la fragmentation du sommeil.

En effet l'oxygène étant le substrat principal du cerveau, ce dernier est particulièrement sensible aux variations de pressions partielles en oxygène dans son environnement. D'autre part bien que l'endothélium cérébral soit connu pour être plus

résistant que l'endothélium périphérique à l'inflammation, les taux sériques élevés de médiateurs inflammatoires rencontrés dans cette pathologie laissent à penser que l'endothélium cérébral est fragilisé par cette inflammation systémique de bas grade.

Afin de pouvoir améliorer les thérapeutiques proposées aux patients souffrant d'un SAOS, il est important d'améliorer les connaissances sur les mécanismes impliqués dans le SAOS. C'est pourquoi ce travail de thèse vise à comprendre et améliorer les connaissances sur les modifications de l'endothélium cérébral pouvant être impliquées dans le SAOS et examiner les mécanismes sous-jacents.

Deuxième partie :

Travaux personnels

Objectif de la thèse

Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil est une pathologie multifactorielle associant des pauses respiratoires (apnée – hypopnée) à des micros éveils (fragmentation du sommeil). L'association de ces deux mécanismes rend son étude sur modèle *in vivo* difficile. Afin de mieux l'appréhender, il est nécessaire d'évaluer son impact global mais également l'impact propre de chacun de ces mécanismes physiopathologiques.

En 2014, Lim and Pack émettent l'hypothèse que les réponses liées aux événements respiratoires chez les patients atteints d'un SAOS pourraient entraîner un dysfonctionnement de la barrière hématoencéphalique (Lim and Pack, 2014). Cette barrière est un système de protection physique et fonctionnel du SNC, qui permet la séparation du compartiment cérébral et de la circulation sanguine. Il a déjà été montré qu'une hypoxie aiguë pouvait modifier la structure de la BHE, mais peu d'études montrent l'effet d'une hypoxie intermittente sur l'intégrité de la BHE. De plus, les voies de signalisation de l'hypoxie intermittente sont multiples, passant principalement par l'activation de la voie HIF-1, qui peut être un intermédiaire pour l'activation de la réponse inflammatoire (Eltzschig and Carmeliet, 2011). De plus le syndrome d'apnée obstructive du sommeil, n'est pas seulement une hypoxie intermittente chronique, c'est également une fragmentation du sommeil, et la modification du pattern de sommeil pourrait induire et/ou maintenir cette réponse inflammatoire (Irwin, 2002). Cette inflammation serait une réponse plus distante des conséquences immédiates du SAOS, mais qui persisterait chez les patients souffrant d'un SAOS, avec un taux sérique en marqueurs inflammatoires plus important que chez les sujets sains, non apnéiques, ce qui a fait l'objet d'une méta-analyse de Nadeem en 2013 (Nadeem et al., 2013).

Dans cette thèse, nous avons tenté de répondre à plusieurs questions :

- ✚ Tout d'abord, le 1^{er} objectif de cette thèse a consisté à évaluer les effets de l'hypoxie intermittente chronique, principal mécanisme lié au SAOS, sur un modèle *in vitro* murin de BHE. Ces travaux sont dans la lignée de ceux entrepris au laboratoire par Morgane Chatard. Ils ont permis d'évaluer l'effet de l'hypoxie intermittente induite par un agent

chimique, l'hydralazine, versus une hypoxie intermittente induite par l'intermédiaire d'une enceinte hermétique sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de BHE. Il nous est apparu également nécessaire de voir si un inhibiteur de la voie HIF-1 α , l'YC-1, pouvait être bénéfique pour protéger la fonctionnalité et l'intégrité de la BHE.

- ✚ Nous nous sommes intéressés ensuite aux mécanismes plus latents du SAOS en évaluant l'influence d'une réponse inflammatoire persistante de bas grade sur l'intégrité du modèle *in vitro* de BHE. En effet, comme décrit dans la revue bibliographique, l'hypoxie intermittente et la fragmentation du sommeil impliquent tous deux l'induction et le maintien d'une réponse inflammatoire persistante de bas grade chez les patients souffrant d'un SAOS. Cette réponse passe par libération de biomarqueurs tels que l'IL-6, l'IL-17 ou encore le TNF- α . Le second objectif a donc été d'étudier ce stress inflammatoire en essayant de comparer l'impact individuel de ces cytokines proinflammatoires avec l'impact de ces mêmes cytokines proinflammatoires associés/combinés, sur un modèle de coculture *in vitro* de BHE murine.
- ✚ Enfin après avoir évalué l'impact individuel de deux des mécanismes associés au SAOS, nous avons effectué une évaluation de l'impact « global » du SAOS, en mesurant l'effet des biomarqueurs sériques de patients atteints d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de barrière hématoencéphalique humaine

Pour pouvoir répondre à ces trois questions, nous avons utilisé les deux modèles de coculture *in vitro* de BHE, que nous avons décrits dans la première partie de ce manuscrit (chapitre 2, paragraphe 8.1). Ces deux modèles consistent à mettre en coculture une monocouche de cellules endothéliales, ayant les caractéristiques essentielles à l'étude d'un endothélium cérébral, avec des astrocytes. Ces derniers ont pour but, dans le cadre de cette thèse, uniquement de favoriser la formation et le maintien de l'endothélium. Cependant nous le verrons par la suite, ils seront également l'une des pistes de réflexion à envisager dans la poursuite de nos travaux.

Etude 1 : Altération (et limitation ?) de l'intégrité endothéliale d'un modèle *in vitro* de BHE, après exposition à un stress hypoxique intermittent en présence ou non d'inhibiteur de la voie HIF-1 α

Travaux Collaboratif avec Dr Morgane Chatard (ex-doctorante au laboratoire) et Dr Anne Briançon-Marjollet (MCF, Université de Grenoble Alpes, Laboratoire HP2, INSERM 1042).

1. Introduction

Dans le cadre du syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS), l'hypoxie intermittente est liée aux collapsus pharyngés transitoires et répétés durant la nuit. Cette hypoxie intermittente lorsqu'elle devient chronique, initie et amplifie les altérations structurelles au niveau du système cérébral. En effet, des modifications hypertrophiques de la substance grise et de la substance blanche dans certaines régions cérébrales cible semblent être retrouvées (par imagerie volumétrique focale) (Palomares et al., 2015; Rosenzweig et al., 2015), entraînant une neuro-inflammation et une hyperperméabilité cérébrale (Kerner and Roose, 2016). Néanmoins, il semblerait que des processus adaptatifs se mettent en place en réponse à cette hypoxie intermittente, que l'on appelle généralement « pré-conditionnement » et qui reflètent la résistance aux lésions post-hypoxie aigue (Manukhina et al., 2016; Navarrete-Opazo and Mitchell, 2014). Cette adaptation a été récemment suggérée chez les patients SAOS avec pour certains auteurs, une hypertrophie globale de la substance grise (Baril et al., 2018).

L'une des hypothèses explicatives des conséquences neurologiques émises récemment est l'altération de la perméabilité ou du fonctionnement de la barrière

hématoencéphalique, par l'intermédiaire de la voie HIF-1 (Lim and Pack, 2014). En effet l'hypoxie cellulaire est un signal d'activation de la voie HIF-1, qui lors de la détection d'un apport insuffisant d'oxygène va entraîner la translocation et la dimérisation des sous-unités de HIF-1, en un complexe fonctionnel, augmentant ainsi l'activation nucléaire de gènes cibles, tels que le VEGF (Engelhardt et al., 2014; Yang et al., 2018).

Il a été montré dans la littérature qu'un stress hypoxique répété conduit à des modifications progressives de la barrière hématoencéphalique. Des altérations de la barrière ont été observées dans un modèle *in vivo* murin soumis à une hypoxie intermittente similaire à celle du SAOS chez l'homme, néanmoins sans changement de perméabilité (Kim et al., 2015). D'autres études parlent d'une altération de la fonction endothéliale cérébrale après une exposition à ce type de stress (Phillips et al., 2004). Peu d'études à l'heure actuelle s'intéressent à l'impact cellulaire de l'hypoxie intermittente sur des modèles de BHE *in vitro*. Dans le cadre du SAOS, seul Xia Dong et al. ont montré qu'une augmentation de l'expression de P-gp dans un modèle d'hypoxie intermittente d'épilepsie, l'interprétant comme l'un des facteurs de la résistance aux médicaments (Xiao-Dong et al., 2008). Notre étude est donc l'une des premières à s'intéresser à l'altération induite par l'hypoxie intermittente dans le cadre du syndrome d'apnée du sommeil. A travers cette étude, nous avons voulu montrer l'influence des méthodes d'induction sur l'altération fonctionnelle de l'endothélium cérébral.

De plus dans la littérature, des preuves existent sur le rôle préventif d'YC-1 (3-(5'-hydroxyethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole), qui est un inhibiteur de la voie HIF-1, sur l'intégrité de la barrière soumis à une hypoxie aigue associée à un œdème cérébral par exemple (Yang et al., 2015). Cependant, son rôle dans l'hypoxie intermittente chronique n'a pas encore été démontré c'est donc l'une des premières études qui s'intéresse à la capacité préventive d'YC-1 dans des modèles d'hypoxie intermittente chronique.

2. Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Afin de répondre à la question, un modèle *in vitro* de BHE murin a été mis en place. L'utilisation d'un modèle murin va permettre la comparaison avec des études sur des modèles *in vivo*. De plus, afin de se rapprocher de la physiologie et de la complexité de la BHE, un modèle de coculture en contact entre des cellules endothéliales et des astrocytes a été réalisé, comme décrit dans le chapitre 2. Paragraphe 8.1. Une lignée immortalisée de cellules endothéliales de souris b.End.3 et une lignée cellulaire d'astrocyte de rat C6 ont permis de réaliser ce modèle. Ces cellules sont cultivées avec un milieu DMEM, riche en glucose.

La première étape de mise en place de ce modèle consiste à ensemercer les astrocytes sur la membrane abluminale de l'insert pendant au minimum 6h, afin qu'elles adhèrent à cette membrane. Une fois adhérentes, l'insert est retourné et les cellules endothéliales sont ensemercées sur la face luminale de l'insert. Cette conformation est cultivée pendant 6 jours avec un changement de milieu tous les jours, avant d'atteindre un plateau de perméabilité, qui durera 2 jours. C'est durant ces deux jours que les expérimentations pourront être réalisées.

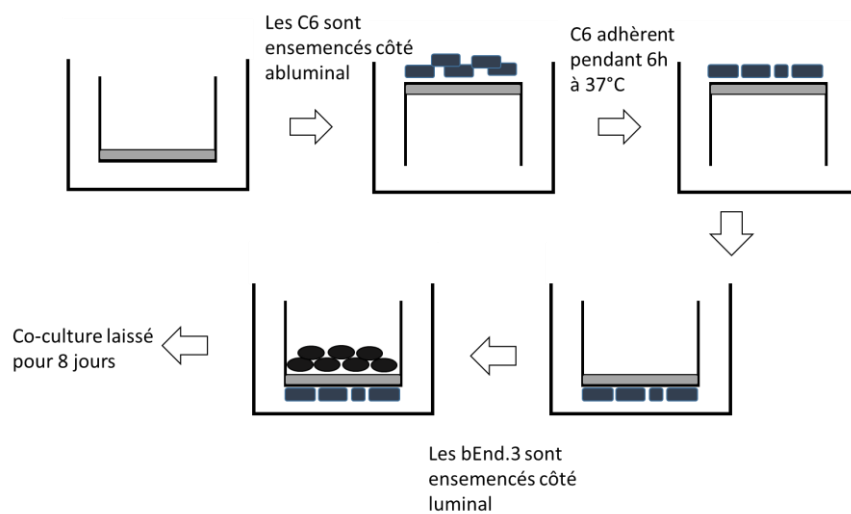


Figure 26 : Illustration schématique de la mise en place du modèle de coculture *in vitro* de BHE, avec dans le compartiment luminal les cellules endothéliales (gris foncé) et dans le compartiment abluminal les cellules astrocytaires (bleu).

Méthodes d'induction de l'hypoxie intermittente

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'effet de deux méthodes d'inductions différentes d'hypoxie intermittente chronique.

✚ Par agent chimique

Dans le cadre d'induction de l'hypoxie par un agent chimique, l'hydralazine s'est avéré un bon agent pharmacologique. Tout d'abord grâce à sa faible cytotoxicité, qui est inférieure à celle du Chlorure de Cobalt. En effet l'hydralazine permet l'induction de HIF-1 et ce sans être cytotoxique après 2h d'exposition à 100 μ M, qui plus est de par son mimétisme d'action comparé à l'utilisation de l'hypoxie dans une enceinte hermétique (Chatard et al., 2017). De plus l'hydralazine est un vasodilatateur qui va inhiber l'enzyme PHD de la voie de signalisation de HIF-1 (Knowles et al., 2004), permettant ainsi la dimérisation des sous-unités de HIF-1 et de mimer une hypoxie au niveau cellulaire.

Dans ce cadre, il a été préalablement montré que HIF-1 α , était exprimé au bout de 2h d'exposition à l'hydralazine, et que 6h suffisaient à un retour au niveau basal de HIF-1 α (Chatard, 2017). A partir de là des cycles hypoxiques ont pu être mis en place, chaque cycle correspondant à 2h d'hydralazine, suivi de 6h de normoxie, c'est-à-dire incuber avec le milieu DMEM classique, afin de revenir à un niveau basal de HIF-1 α avant de ré-induire l'hypoxie. Cette séquence est répétée 3 fois consécutivement.

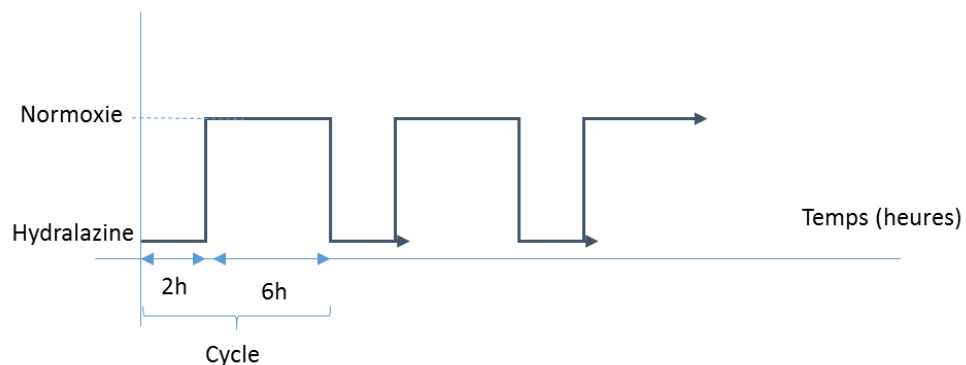


Figure 27 : Représentation schématique des cycles hypoxiques induit par un agent chimique : l'hydralazine.

✚ Par enceinte hermétique

Une autre méthode d'induction de l'hypoxie, est l'utilisation d'une enceinte hermétique. L'utilisation de cette enceinte implique des cultures réalisées sur plaque

24 puits spécifiques qui est perméable au gaz (Imaging Plate FC, 24 well, TC-surface-Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Ce système hypoxique qui a été décrit par Minoves et al permet de réaliser des cycles d'hypoxies intermittentes de 5 minutes – 5 minutes, avec 5 minutes à 2% de FiO₂, afin de mimer l'hypoxie et 5 minutes à 16 %, reflétant la normoxie (Minoves et al., 2017). Afin de pouvoir comparer les résultats de ces « inducteurs », il a été décidé de réaliser des cycles alternant 2h d'hypoxie intermittente suivie de 6h de normoxie complète, le tout répété 3 fois.

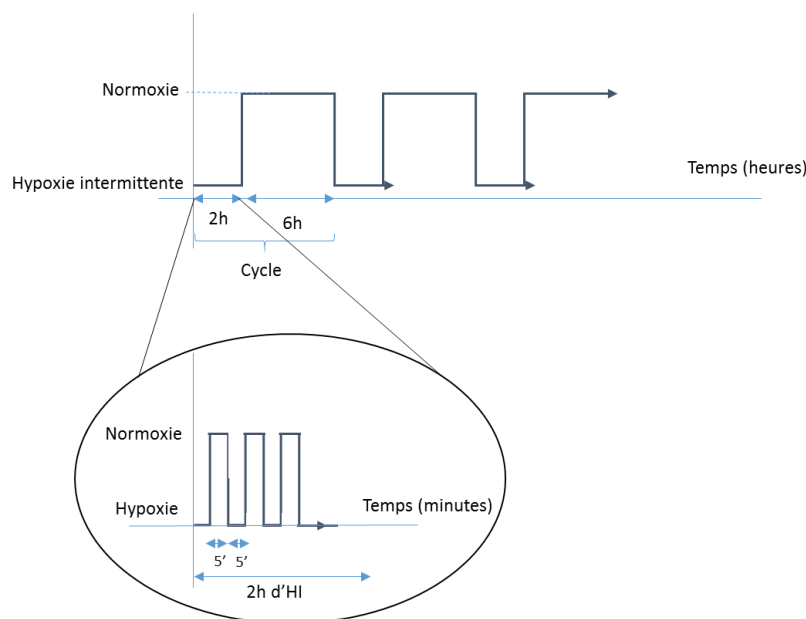


Figure 28 : Représentation schématique des cycles induit par une enceinte hermétique.

Méthodes d'inhibition de l'hypoxie

Le deuxième objectif de cette étude, est d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un inhibiteur de la voie HIF-1, l'YC-1 (3-(5'-hydroxyethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole). La dose cytotoxique a été déterminée au préalable et un prétraitement de 30 minutes avec 6 µg/mL d'YC1. Le choix d'YC-1 s'est fait suite à l'étude de la littérature, qui le décrit comme un inhibiteur de HIF-1 α , et ce dernier n'est pas substrat de P-gp et MRP-1, deux des ABC-transporteurs d'efflux qui caractérisent la barrière hémato-encéphalique (Chen et al., 2010; Yan et al., 2011; Yeh et al., 2007).

Évaluation des caractéristiques de la barrière

Les modèles de barrière hématoencéphalique sont caractérisés par l'évaluation de paramètres spécifiques qui rendent le modèle utilisable pour les expérimentations

d'altération de la BHE. Afin de déterminer l'influence de l'hypoxie sur le modèle de BHE, ces différentes caractéristiques vont être évaluées.

La **perméabilité** a été évaluée par une mesure du passage paracellulaire d'un composé fluorescent : le sodium fluorescéine (Na-Fl : 376 Da). Pour cela après avoir induit le stress hypoxique, le Na-Fl en concentration 10µg/ml dans du Ringer-Hepes, est placé dans le compartiment abluminal avant d'être incubé pendant 1h à 37°C. Au bout d'une heure on récupère dans le compartiment luminal, un volume de 100µL et la concentration de Na-Fl est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Emission 530nm, Excitation 485nm). Le coefficient de perméabilité apparente est alors calculé suivant la formule suivante :

$$P_{app} = \frac{V_r}{C_0} \times \frac{1}{S} \times \frac{C_1}{t}$$

Avec P_{app} représentant la perméabilité apparente, le V_r : volume receveur, C_0 et C_1 pour la concentration initiale et la concentration après 1h de Na-Fl, t correspond au temps d'incubation et S représente la surface de la membrane.

En parallèle de la perméabilité sont évaluées par cell-ELISA sur les cellules entières l'expression **des jonctions serrées**. Ces cell-ELISA sont faits à façon au sein du laboratoire. Pour cela les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde, avant d'être perméabilisées à l'aide de 3 % de H₂O₂-méthanol, permettant le blocage des sites endogènes de la peroxydase. Puis le blocage des sites aspécifiques est fait à l'aide d'un tampon de blocage composé de 5% de NGS décomplémenté et 1g de BSA dans 50ml de PBS. Les anticorps primaire polyclonal de lapin anti-ZO-1 (4µg/mL) ou anti Claudine-5 (2µg/mL) sont ensuite incubés pendant 1h, puis détectés dans un second temps par un anticorps secondaire anti-lapin couplé à une HRP. Après ajout de TMB, la réaction colorimétrique est mesurée par un lecteur de plaque (490nm).

Des cell-ELISA sur cellules entières à détection spécifiques des **ABC-transporteurs** de type P-gp et MRP-1 ont également été réalisés selon le même protocole avec des anticorps primaires monoclonal de souris anti-P-gp (2µg/mL), détectés par la suite grâce à un anticorps secondaire anti-souris. Enfin un anticorps polyclonal de lapin anti-MRP-1 (10µg/mL) a également été utilisé.

Une courbe standard a été réalisée pour interpréter les résultats. Elle est basée sur une série de dilutions d'une protéine standard dont la concentration est connue. Ceci a été utilisé pour tracer une droite évaluant la densité optique obtenue pour chaque concentration de peptide. Ensuite, la concentration d'antigène dans l'échantillon a été extrapolée à partir de l'équation linéaire résultant de cette courbe standard. Des contrôles positifs et négatifs ont également été mesurés pour limiter le risque d'erreur.

Analyse statistique

Une analyse statistique a été réalisée à partir du logiciel GraphPad. Cette analyse est non paramétrique de type Kruskal Wallis et a été suivie d'une analyse postHoc de type Dunns, après vérification de la non normalité de nos données.

3. Résultats

Prévention de l'altération de la BHE par inhibition de la voie HIF-1 avant un stress hypoxique intermittent induit par l'hydralazine

Evaluation des caractéristiques physiques

Perméabilité apparente (Papp)

La mesure de perméabilité apparente, nous montre une augmentation progressive de la perméabilité après un stress répété à l'hydralazine. Avec une Papp qui passe de $1.58 \pm 0.08 \text{ cm.s}^{-1}$ à 3.64 ± 0.09 au 1^{er} cycle, 4.04 ± 0.08 au 2nd cycle et 4.97 ± 0.17 au 3^{ème}. Tandis que lorsque l'on inhibe la voie HIF-1 à l'aide d'YC-1, on observe une diminution de cette perméabilité comparée à l'hydralazine avec un retour à une perméabilité semblable à celle retrouvée en condition normoxique. La Papp étant de $1.78 \pm 0.04 \text{ cm.s}^{-1}$ au 1^{er} cycle, 1.82 ± 0.06 au 2nd cycle et 1.98 ± 0.17 au 3^{ème} cycle.

Apparent Permeability of Na-Fl

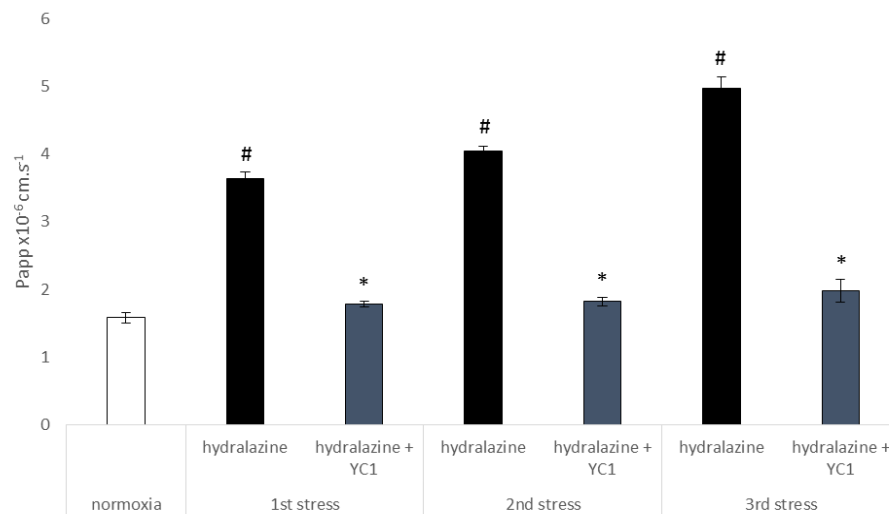


Figure 29 : Mesure de perméabilité membranaire apparente au Sodium Fluorescéine sur le modèle de coculture b.end.3/C6 après 3 cycles d'hypoxie intermittent induit par un agent chimique, l'hydralazine, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm s.e.m. (n=6). # p < 0.05 en comparant hydralazine versus normoxie * p < 0.05 en comparant hydralazine versus hydralazine/YC-1.

Expression des jonctions serrées

L'évaluation de l'expression des jonctions serrées est en concordance avec les résultats observés lors de la mesure de perméabilité au Na-Fl.

- ✚ **Avec l'hydralazine** : on observe une diminution significative de l'expression des protéines de jonctions serrées, avec la diminution de 5.62 ± 0.51 $\mu\text{g/mL}$ à 4.21 ± 0.7 $\mu\text{g/mL}$ lors du 1^{er} cycle, puis 2.28 ± 0.56 $\mu\text{g/mL}$ au 2nd cycle et enfin 1.53 ± 0.38 $\mu\text{g/mL}$ lors du dernier cycle pour l'expression de ZO-1 en comparaison avec la condition normoxique. La protéine claudine-5 évolue de la même manière avec une diminution significative de 11.06 ± 0.61 $\mu\text{g/mL}$ à 6.97 ± 0.58 lors du 1^{er} cycle, puis 3.23 ± 0.45 $\mu\text{g/mL}$ au 2nd cycle et enfin 2.73 ± 0.44 $\mu\text{g/mL}$ au dernier par rapport à la condition normoxique.
- ✚ **Inhibition avec YC-1** : Lorsque l'on effectue un prétraitement pendant 30 minutes avec YC-1 on observe une augmentation significative de l'expression

des jonctions serrées au cours des cycles par rapport à l'expression en présence d'hydralazine seulement. En effet, ZO-1 voit son expression passer de 4.21 ± 0.7 $\mu\text{g/mL}$ à 4.57 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$ lors du 1^{er} cycle, puis de 2.28 ± 0.56 $\mu\text{g/mL}$ à 4.97 ± 0.7 $\mu\text{g/mL}$ au 2nd cycle et enfin de 1.53 ± 0.38 $\mu\text{g/mL}$ à 5.09 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$ lors du dernier cycle hypoxique. La même évolution est observée pour l'expression de Claudine-5, qui augmente significativement par rapport à un stress sous hydralazine de 6.97 ± 0.58 $\mu\text{g/mL}$ à 9.98 ± 0.12 $\mu\text{g/mL}$ lors du 1^{er} cycle, puis de 3.23 ± 0.45 $\mu\text{g/mL}$ à 8.97 ± 0.15 $\mu\text{g/mL}$ au 2nd cycle et enfin de 2.73 ± 0.44 $\mu\text{g/mL}$ à 10.51 ± 0.37 $\mu\text{g/mL}$ lors du dernier cycle hypoxique.

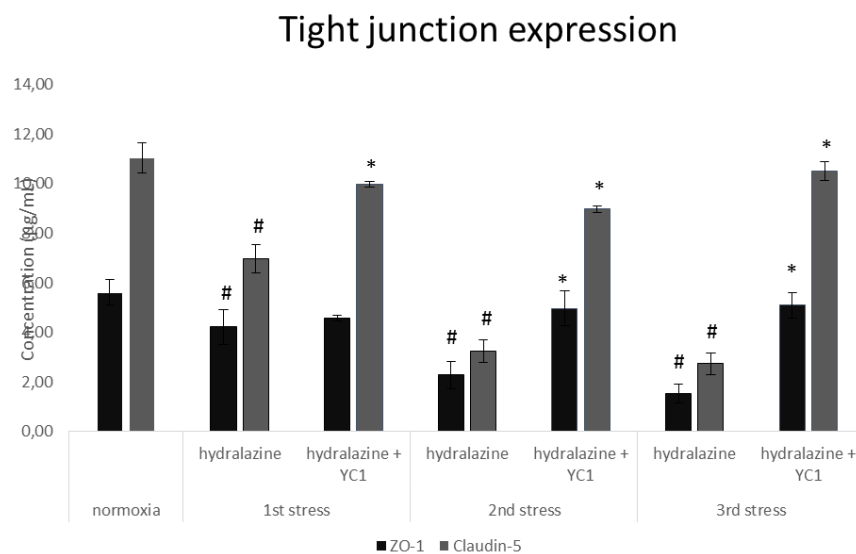


Figure 30 : Expression des protéines de jonctions serrées Zonula Occludens (ZO-1) et de Claudine-5 après 3 cycles d'hypoxie intermittente induit par un agent chimique, l'hydralazine, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm s.e.m. (n=6). # $p < 0.05$ en comparant hydralazine versus normoxie * $p < 0.05$ en comparant hydralazine versus hydralazine/YC-1.

Les caractéristiques métaboliques/ou fonctionnelles

Expression des protéines ABC-transport par cell-ELISA

L'évaluation de l'expression des pompes d'efflux a été évaluée à l'aide d'un cell-ELISA sur cellules entières.

- + **Avec l'hydralazine** : on observe une augmentation significative de l'expression des protéines ABC-transporteurs, de $5.22 \pm 0.86 \mu\text{g/mL}$ à $5.66 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ lors du 1^{er} cycle, puis $7.13 \pm 1.29 \mu\text{g/mL}$ au 2nd cycle et enfin $8.72 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ lors du dernier cycle pour l'expression de P-gp en comparaison avec la normoxie. La protéine MRP-1 évolue de la même manière avec une diminution significative de $5.67 \pm 1.22 \mu\text{g/mL}$ à $7.51 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$ lors du 1^{er} cycle, puis $9.31 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$ au 2nd cycle et enfin $11.07 \pm 0.61 \mu\text{g/mL}$ au dernier par rapport à la condition normoxique.
- + **Inhibition avec YC-1** : Lorsque l'on effectue un prétraitement pendant 30 minutes avec YC-1, on observe une diminution significative de l'expression des protéines de pompes d'efflux au cours des cycles par rapport à l'expression en présence d'hydralazine seulement. En effet, P-gp voit son expression qui passe de $5.66 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ à $5.08 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ lors du 1^{er} cycle, puis de $7.13 \pm 1.29 \mu\text{g/mL}$ à $4.05 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ au 2nd cycle et enfin de $8.72 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ à $4.02 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ lors du dernier cycle hypoxique. La même évolution est observée pour l'expression de MRP-1, qui augmente significativement par rapport à un stress sous hydralazine de $7.51 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$ à $6.72 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ lors du 1^{er} cycle, puis de $9.31 \pm 1.34 \mu\text{g/mL}$ à $6.03 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ au 2nd cycle et enfin de $11.07 \pm 0.61 \mu\text{g/mL}$ à $6.49 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ lors du dernier cycle hypoxique.

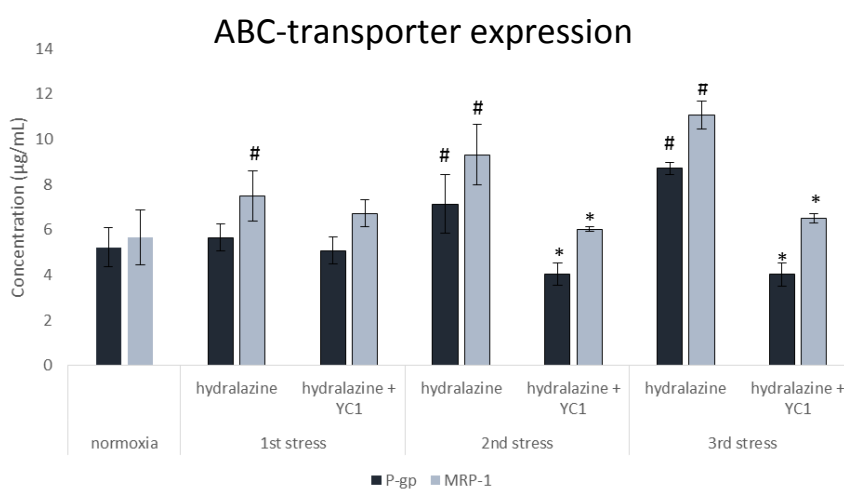


Figure 31 : Expression des ABC-transporteurs de type P-glycoprotéine (P-gp) et MRP-1 après 3 cycles d'hypoxie intermittente induit par un agent chimique, l'hydralazine, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm s.e.m. (n=6). # $p < 0.05$ en comparant hydralazine versus normoxie * $p < 0.05$ en comparant hydralazine versus hydralazine/YC-1.

Prévention de l'altération de la BHE par inhibition de la voie HIF-1 avant un stress hypoxique répété induit par une enceinte hermétique

Les caractéristiques physiques

Perméabilité apparente

Afin d'évaluer les caractéristiques de la voie paracellulaire de la BHE, des mesures de perméabilité apparente au Na-FI ont été effectuées.

- ✚ Lors d'un stress induit grâce à **une enceinte hermétique**, nous observons une augmentation de 1.58 ± 0.08 à 2.78 ± 0.17 cm.s^{-1} après le 1^{er} cycle, puis 2.6 ± 0.11 au 2nd cycle avant de revenir à un niveau « normoxique » au 3^{ème} cycle à 1.82 ± 0.17 cm.s^{-1} . On observe donc une adaptation au niveau de la perméabilité endothéliale de notre modèle.
- ✚ **Inhibition avec YC-1** : l'utilisation d'YC1 en prétraitement combiné avec l'hypoxie dite « physique » c'est-à-dire induite par une enceinte hermétique, nous montre une diminution significative de la perméabilité apparente lors des deux premiers cycles. La P_{app} passe de 2.78 ± 0.17 à 2.24 ± 0.17 cm.s^{-1} après le 1^{er} cycle, puis de 2.6 ± 0.11 à 2.11 ± 0.22 au 2nd cycle. Nous n'observons cependant pas de différence entre normoxie, hypoxie, et hypoxie associée au prétraitement d'YC-1 au 3^{ème} cycle avec une perméabilité apparente de 1.71 ± 0.36 cm.s^{-1} .

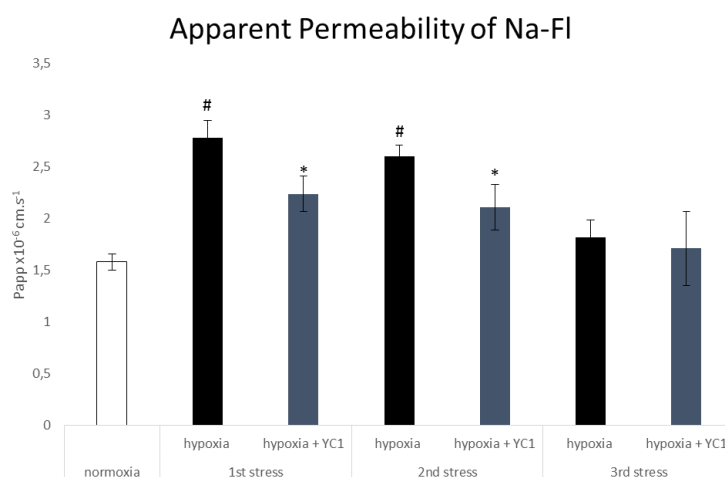


Figure 32 : Mesure de perméabilité membranaire apparente au Sodium Fluorescéine sur le modèle de coculture b.end.3/C6 après 3 cycle d'hypoxie intermittent induit par une enceinte

hermétique, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm s.e.m. (n=6). # $p < 0.05$ en comparant hypoxie par enceinte hermétique versus normoxie * $p < 0.05$ en comparant hypoxie par enceinte hermétique versus hydralazine/YC-1.

Evaluation de l'expression des jonctions serrées

L'évaluation de l'expression des jonctions serrées est en concordance avec les résultats observés lors de la mesure de perméabilité au Na-Fl.

- ✚ **L'induction par une enceinte hermétique** entraîne une diminution de l'expression de ZO-1 au cours des deux premiers cycles, avec diminution significative de 5.62 ± 0.51 $\mu\text{g/mL}$ à 3.63 ± 0.98 $\mu\text{g/mL}$ puis 3.21 ± 0.52 $\mu\text{g/mL}$. Cependant il semblerait que l'expression de ZO-1 se stabilise au 3^{ème} cycle avec une expression de 3.28 ± 0.45 $\mu\text{g/mL}$. La même évolution est observée au cours des deux premiers cycles pour l'expression de Claudine-5 avec une diminution significative de 11.06 ± 0.61 $\mu\text{g/mL}$ à 7.42 ± 0.85 $\mu\text{g/mL}$ après un cycle puis 3.99 ± 0.58 $\mu\text{g/mL}$ après deux cycles d'hypoxie intermittente. Cependant son expression semble augmentée après le 3^{ème} cycle hypoxique jusqu'à 6.4 ± 0.72 $\mu\text{g/mL}$, apportant ainsi l'une des explications de la diminution et de l'adaptation de la perméabilité apparente au Na-Fl au cours du 3^{ème} cycle.
- ✚ **L'inhibition avec YC-1** entraîne une augmentation de l'expression de ZO-1 au cours des cycles, avec une augmentation significative de 3.63 ± 0.98 $\mu\text{g/mL}$ à 5.59 ± 0.05 $\mu\text{g/mL}$ puis de 3.21 ± 0.52 $\mu\text{g/mL}$ à 4.38 ± 0.12 $\mu\text{g/mL}$. De plus il semblerait que l'expression de ZO-1 se stabilise au 3^{ème} cycle avec une expression de 6.69 ± 0.06 $\mu\text{g/mL}$, similaire à l'expression de ZO-1 en condition normoxique. La même évolution est observée au cours des cycles pour l'expression de Claudine-5 avec une augmentation significative de 7.42 ± 0.85 $\mu\text{g/mL}$ à 10.63 ± 0.14 $\mu\text{g/mL}$ puis de 3.99 ± 0.58 $\mu\text{g/mL}$ à 8.97 ± 0.16 $\mu\text{g/mL}$. . Et comme pour l'expression de ZO-1, l'expression de claudine-5 au 3^{ème} cycle est augmentée en présence d'YC-1, et est similaire à celle en condition de normoxique avec une expression de 11.28 ± 0.28 $\mu\text{g/mL}$.

Tight junction expression

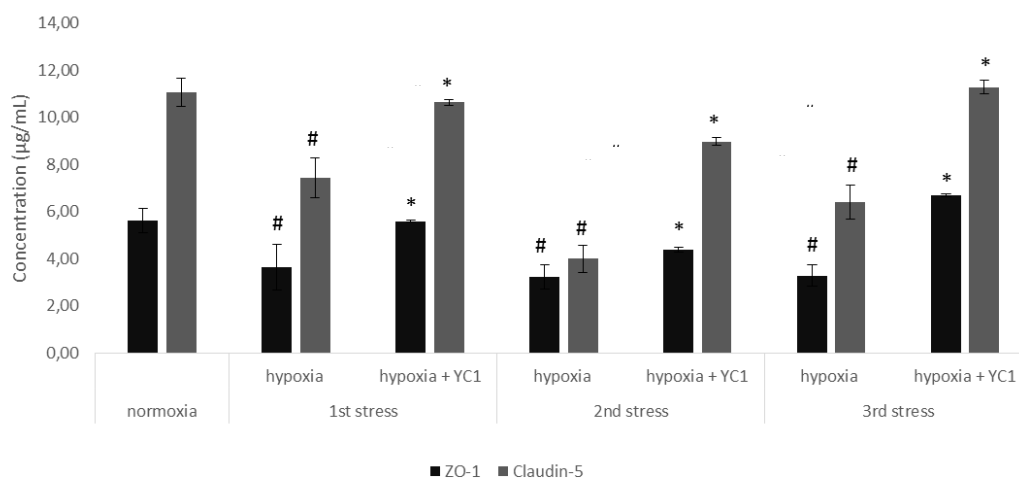


Figure 33 : Expression des protéines de jonctions serrées Zonula Occludens (ZO-1) et de Claudine-5 après 3 cycle d'hypoxie intermittente induit par une enceinte hermétique, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm s.e.m. (n=6). # $p < 0.05$ en comparant hypoxie par enceinte hermétique versus normoxie * $p < 0.05$ en comparant hypoxie par enceinte hermétique versus hydralazine/YC-1.

Les caractéristiques métaboliques/ou fonctionnelles

Expression des ABC-transporteurs

L'évaluation de l'expression des pompes d'efflux (ABC-transporteurs) est effectuée à l'aide d'un cell-ELISA et nous montre une adaptation des cellules endothéliales, qui mettent en place un système de défense pour lutter contre l'entrée des composés cytotoxiques.

🚦 **L'hypoxie physique par une enceinte hermétique** entraîne une augmentation de l'expression de P-gp après deux cycles, avec une augmentation significative de 5.22 ± 0.86 µg/mL à 6.86 ± 1.08 µg/mL au 2^{ème} cycle et de 5.22 ± 0.86 µg/mL à 8.25 ± 1.4 µg/mL au 3^{ème} cycle. La même évolution est observée au cours des cycles pour l'expression de MRP-1 avec une augmentation significative de 5.67 ± 1.22 µg/mL à 9.44 ± 1.12 µg/mL et 11.97 ± 1.35 µg/mL lors du 2^{ème} et 3^{ème} cycle respectivement. Cependant leur expression au cours du 1^{er} cycle à

tendance à augmenter comparé à la condition normoxie, avec une expression de $5.72 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ pour P-gp et de $7.28 \pm 1.48 \mu\text{g/mL}$ pour MRP-1.

🌈 **L'inhibition avec YC-1** entraîne une diminution de l'expression de MRP-1 au cours des cycles, avec une diminution significative de 53 % au 1^{er} cycle, de 57 % au 2nd et de 58 % au 3^{ème} comparé à leur expression sans inhibiteur. Pour ce qui est de la protéine P-gp, l'effet de YC-1 est moindre, avec une diminution significative de son expression uniquement au 3^{ème} cycle à un niveau d'expression semblable à la normoxie, c'est-à-dire $5.65 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ au 3^{ème} cycle comparé à $5.22 \pm 0.86 \mu\text{g/mL}$ en normoxie.

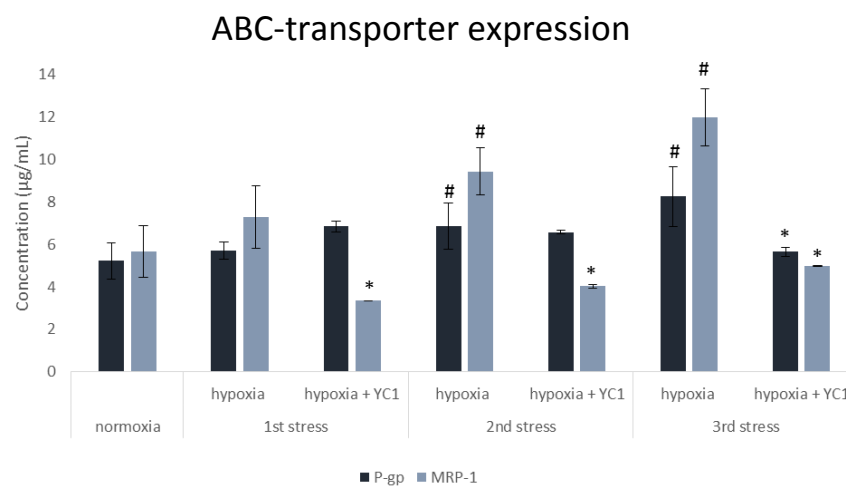


Figure 34 : Expression des ABC-transporteurs de type P-glycoprotéine (P-gp) et MRP-1 après 3 cycles d'hypoxie intermittente induits par une enceinte hermétique, avec ou sans inhibiteur de la voie HIF (YC1). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm s.e.m. (n=6). # $p < 0.05$ en comparant hypoxie par enceinte hermétique versus normoxie * $p < 0.05$ en comparant hypoxie par enceinte hermétique versus hydralazine/YC-1.

4. Discussion

Du fait de sa sensibilité à l'oxygène, le cerveau est largement influencé par la pression partielle en oxygène locale. Une modification de cette pression partielle peut entraîner des modifications structurelles secondairement. Or, de nombreuses pathologies sont associées à des changements locaux de pression partielle d'oxygène. C'est le cas du syndrome d'apnée du sommeil, qui est en partie caractérisé par une hypoxie intermittente chronique. Les conséquences cérébrovasculaires et cognitives

associées à ce syndrome ont été bien démontrées (Beaudin et al., 2017; Bucks et al., 2013; Sforza et al., 2010), cependant les mécanismes et altérations sous-jacentes sont moins connues. Des hypothèses émergent sur la perte de perméabilité cérébrale, qui serait associée à une altération de la barrière hématoencéphalique dans le cadre du SAOS (Lim and Pack, 2014). C'est pourquoi l'objectif de ce travail, fut d'évaluer l'effet de deux méthodes d'induction d'hypoxie intermittente, à l'aide de cycles alternant hypoxie-réoxygénation, afin d'améliorer les connaissances sur les risques cellulaires post-hypoxiques associés au SAOS, mais également d'évaluer le potentiel thérapeutique, d'un inhibiteur de la voie HIF-1 α : YC-1.

Dans cette étude, nous montrons des modifications de l'intégrité de l'endothélium de notre modèle *in vitro* de BHE après une exposition répétée à l'hypoxie intermittente que ce soit en hypoxie dite « chimique » : hydralazine ou « physique » : l'enceinte hermétique.

Prévention de l'altération de la BHE par inhibition de la voie HIF-1 avant un stress hypoxique intermittent induit par un agent chimique : l'hydralazine ?

L'observation des caractéristiques endothéliales d'un modèle de BHE *in vitro* nous montre une altération progressive, liée aux stress hypoxiques répétés par ajout d'hydralazine, avec une augmentation de la perméabilité apparente au Na-Fl, qui est de plus en plus importante au cours des cycles hypoxiques successifs. Cette augmentation de perméabilité est associée à une diminution de l'expression des jonctions serrées ZO-1 et Claudin-5. On observe alors **une ouverture progressive de la voie paracellulaire**, cette ouverture est le reflet des échanges entre le compartiment cérébral et la circulation sanguine. Cette ouverture implique donc le passage éventuel à travers cette voie de composés potentiellement toxiques. En parallèle les cellules endothéliales, semblent mettre en place un système de défense et de détoxification en augmentant l'expression des pompes d'efflux, tel que P-gp et MRP-1. Cette augmentation progressive de l'expression de ces protéines ABC-transports peut être interprétée comme **un mécanisme de protection mis en place par la BHE** afin de limiter les conséquences associées à la perte d'étanchéité de la barrière.

Lorsque l'on inhibe préalablement la voie HIF-1 à l'aide d'YC-1, nous montrons une **réversion de l'intégrité** du modèle lors des cycles, avec une perméabilité et une expression des protéines caractéristiques de notre modèle, i.e. P-gp, MRP-1, ZO-1 et claudine-5, qui est semblable à celle évaluée dans un modèle de BHE mis en normoxie.

En conclusion, en induisant un stress hypoxique avec de l'hydralazine, nous induisons bien une altération progressive de l'intégrité de la barrière mais celle-ci est entièrement réversible avec une pré-incubation d'YC-1. Or YC-1 est un inhibiteur de la voie HIF-1 α , on a donc ici un stress par agent chimique qui active bien cette voie HIF-1, et un inhibiteur qui a un potentiel thérapeutique intéressant dans ce modèle hypoxique « chimique ».

Bien que l'hydralazine ait montré la possibilité de créer des cycles contrôlables, réversibles, et reproductibles, mais également son potentiel mimétique en comparaison à l'hypoxie « physique » (Chatard et al., 2017). Le stress hypoxique intermittent induit ici, est un stress hypoxique long (2h d'hypoxie-6h normoxie) et qui est donc éloigné de la physiopathologie, que l'on retrouve dans un SAOS par exemple. C'est pourquoi, nous avons voulu comparer l'effet de ce stress à un stress hypoxique intermittent physique induit par une enceinte hermétique qui permet d'induire des stress hypoxiques plus courts et plus en adéquation avec la physiopathologie de l'apnée du sommeil.

Prévention de l'altération de la BHE par inhibition de la voie HIF-1 avant un stress hypoxique répété induit par une enceinte hermétique (méthode de (Minoves et al., 2017)) ?

A la suite d'un stress hypoxique intermittent induit dans une enceinte hermétique, nous observons une altération de l'intégrité des cellules endothéliales du modèle de BHE. Cependant cette altération semble ne plus avoir lieu après plusieurs cycles d'hypoxie intermittente et de normoxie consécutifs. Ce qui suggère un **processus adaptatif** des cellules endothéliales au cours du stress hypoxique « physique ».

De plus lorsque l'on inhibe la voie HIF-1 à l'aide d'YC-1, de la même manière que précédemment, nous n'observons pas de réversion complète. L'inhibiteur YC-1 semble diminuer l'impact de l'hypoxie intermittente dans les premiers cycles mais n'entraînent pas de retour de la perméabilité apparente à son niveau en condition normoxique. On a donc une **réversion incomplète**, qui suggère que d'autres mécanismes puissent entrer en jeu dans l'hypoxie intermittente répétée, tels que le stress oxydant ou encore les voies proinflammatoires par l'intermédiaire de l'activation de NF- κ B ou de la sécrétion de cytokines tels que l'IL-6, ou le TNF- α .

Cependant nos travaux comportent des limites, l'une d'elles concerne le modèle mis en place. En effet ce modèle est un modèle de coculture entre des cellules endothéliales et des cellules astrocytaires, et nous nous intéressons uniquement à l'effet endothélial, sans prendre en compte l'influence de l'hypoxie physique au niveau astrocytaire. Or, ces cellules peuvent s'activer en réponse à une hypoxie. Dans le même sens l'hydralazine est appliqué uniquement du côté endothélial ce qui entraîne un questionnement sur la capacité de cette agent chimique à traverser la barrière et à venir activer les astrocytes situés en contact de l'endothélium, toutes ces questions concernant le comportement astrocytaire sont évidemment des perspectives à ces travaux et devront être investiguer pour mieux comprendre les réponses différentes entre nos deux méthodes d'induction.

En conclusion, nous démontrons ici que le stress hypoxique intermittent induit une ouverture de la voie paracellulaire progressive qui pourrait être l'une des premières explications aux déficits cognitifs observés chez les patients souffrant de SAOS. Cependant dans le cadre de l'hypoxie intermittente induite par une enceinte hermétique, qui est plus proche de la physiopathologie du SAOS, on observe une adaptation de l'endothélium. Ce type d'adaptation, qui est possiblement un pré-conditionnement hypoxique est également retrouvé en clinique, et il est même envisagé pour son potentiel thérapeutique (Navarrete-Opazo and Mitchell, 2014; Stowe et al., 2011), sans pour autant que les voies mécanistiques impliqués ne soient encore connues (Dematteis et al., 2008; Verges et al., 2015).

De plus la réversion incomplète de l'altération de l'endothélium en présence d'un inhibiteur de la voie HIF-1, suggère l'implication d'autres voies de signalisation dans cette dernière situation. On pourrait ainsi envisager que le stress oxydatif ainsi que l'inflammation associés à l'hypoxie intermittente, dont on retrouve des biomarqueurs dans le SAOS, peuvent influencer également le dysfonctionnement endothélial micro-vasculaire cérébral (Jordan et al., 2006; Jullian-Desayes et al., 2015).

Le syndrome d'apnée du sommeil est une pathologie multifactorielle, impliquant l'hypoxie intermittente mais également la fragmentation du sommeil. Toutes deux sont connus pour induire une réponse inflammatoire de bas grade et persistante. De plus, nous venons de démontrer, dans l'étude précédente, que bien que l'on inhibe la voie principale de l'hypoxie : HIF-1, nous n'avons pas de réversion complète des caractéristiques de notre modèle *in vitro* de BHE comme dans le cas de l'inhibition avec une hypoxie induite par un activateur chimique de la voie HIF-1. On émet alors l'hypothèse que d'autres voies soient impliquées, comme la réponse inflammatoire.

Si l'on associe les résultats de l'étude n°1 avec la littérature du SAOS, qui évoque une augmentation du taux sériques de biomarqueurs inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-17 et le TNF- α . Il était donc naturel pour nous de poursuivre ces travaux en évaluant cette réponse inflammatoire au niveau de cette même structure cérébrale, qu'est la barrière hémato-encéphalique.

Etude 2 : Altération de l'intégrité de l'endothélium cérébrale d'un modèle *in vitro* de BHE soumis à un stress inflammatoire chronique

(Travaux qui font l'objet d'un article en révision dans **Brain research**)

1. Introduction

La réponse inflammatoire est un processus protecteur mis en place par l'organisme pour contrer diverses agressions (infection par un pathogène, allergie, blessure,...) et qui permet de réparer les tissus lésés. C'est un processus dynamique et réversible. Une fois la rencontre entre la lésion et/ou le pathogène, il y a activation des cellules de l'inflammation qui vont déclencher le processus inflammatoire en libérant

et sécrétant des cytokines et chimiokines proinflammatoires tels que l'interleukine-6, et l'interleukine-8.

De nombreuses pathologies tels que le SAOS, induisent la persistance de cet état inflammatoire et ceci de manière irréversible (Kheirandish-Gozal and Gozal, 2019; Unnikrishnan et al., 2015). Cela entraîne une hyperplasie cérébrale et une destruction tissulaire, la présence de cytokines sur le site de destruction, favorise le maintien des cellules immunes sur le site inflammatoire. Cependant les raisons de cette inflammation persistante de bas grade sont encore peu connues. Néanmoins certaines molécules inflammatoires sont retrouvées dans diverses pathologies inflammatoires chroniques. Parmi ces médiateurs, on trouve les lymphocytes de type T helper (LTh) -17, sécréteur d'IL-17, mais également des cytokines proinflammatoires de type IL6 et du TNF- α (Libby, 2007; Miossec and Kolls, 2012). La réponse neuro-inflammatoire est un élément essentiel dans l'immunité du SNC, or ces processus inflammatoires systémiques peuvent avoir un effet délétère sur la BHE (Varatharaj and Galea, 2017).

Généralement les études sur la réponse inflammatoire portent sur l'effet d'une seule cytokine, et peu d'études associent les molécules inflammatoires. Cette combinaison est pourtant représentative des conditions physiopathologiques observées dans le processus d'apnée du sommeil. Ainsi on sait que l'IL-6 et le TNF- α , induisent une modification de la voie paracellulaire avec diminution de l'expression de ZO-1 (Rochfort and Cummins, 2015; de Vries et al., 1996) ainsi que la modification de l'expression et de l'activité de P-gp, l'une des principales pompes d'efflux (Hartz et al., 2006; Poller et al., 2010). L'IL-17 est quant à elle moins étudiée, mais elle a une place importante dans le maintien de l'inflammation (Miossec et al., 2009), et elle est impliquée dans la modification de la perméabilité paracellulaire de la BHE avec modification de la distribution de ZO-1 (Huppert et al., 2009; Kebir et al., 2007).

Concernant la combinaison des cytokines, seules quelques études portent sur la BHE, ces études évoquent une interaction entre les différentes cytokines proinflammatoires (Granet and Miossec, 2004; Hot et al., 2012). Cependant, ces interactions restent néanmoins peu étudiées, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la comparaison de l'effet de cytokines proinflammatoires exposées seules ou en association sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique.

2. Matériels et méthodes

Pour cette étude nous avons mis en place un modèle *in vitro* de coculture en contact entre des cellules endothéliales et des astrocytes murins (décrit dans le chapitre 2, paragraphe 8.1). Ce modèle est soumis à un stress inflammatoire qui se veut de bas grade (faible concentration) et persistant (longue exposition). Pour cela différentes interleukines connues pour leurs implications dans le syndrome d'apnée du sommeil sont utilisées (IL-6, IL-17, TNF- α). Afin d'estimer l'influence d'un stress inflammatoire sur les caractéristiques physiques et fonctionnelles de la BHE, des mesures de perméabilité apparente au Na-FI ont été réalisées. Ces résultats d'étanchéité ont été complétés par l'évaluation de l'expression des jonctions serrées à l'aide d'un cell-ELISA sur cellules entières. Enfin l'expression des ABC-transporteurs a également été évaluée par cell-ELISA ainsi que leurs activités, qui ont été estimées grâce à des tests de fonctionnalité par accumulation.

3. Résultats

Notre étude montre que 24h de stress inflammatoire conduit à l'ouverture de la BHE, reflétée par une augmentation de la perméabilité apparente au Na-FI associé à une diminution de la résistance électrique transendothéliale (*Cf Figure 3-4*). Cette ouverture de la BHE est corrélée à une diminution significative de l'expression de ZO-1 et Claudin-5 (*Cf Figure 5*), ce qui implique une entrée possible des composés cytotoxiques dans le compartiment cérébral. Afin de compenser cette perte d'intégrité paracellulaire, les cellules endothéliales tentent de compenser en augmentant l'efflux des composés à l'extérieur du compartiment cérébral. On observe ainsi dans ces conditions une augmentation de l'expression et de la fonctionnalité de P-gp et MRP-1 (*Cf Figure 6-7*).

On observe donc une perte d'intégrité de notre modèle de BHE après 24h de stress inflammatoire. Cette perte indique une ouverture de la voie paracellulaire qui est associée à l'augmentation de la perméabilité. Mais on observe aussi une régulation positive de la voie transcellulaire, qui est le principal mécanisme de défense de l'endothélium. De plus, cette modification des caractéristiques paracellulaires et transcellulaires dans notre modèle de BHE est

d'autant plus importante quand nous associons les 3 cytokines proinflammatoires.

4. Discussion

On confirme ici qu'un stress inflammatoire induit une dérégulation de la BHE, mais également que cette perturbation est plus importante en associant les cytokines, ce qui fait émerger l'hypothèse d'une action cumulative et/ou synergique de ces molécules proinflammatoires sur ces désordres membranaires. Certaines études vont dans ce sens, et par exemple en 2009, Nichols et al. ont montré que l'IL-17 peut favoriser l'effet du TNF- α (Nichols et al., 2009) et cette action synergique semble être réciproque avec une activation de l'IL-17 grâce au TNF- α (Miossec and Kolls, 2012). De plus il semble que l'effet du TNF- α puisse être médié par la libération d'interleukine 6 par l'intermédiaire de l'activation de la voie NFkB (Rochfort et al., 2016). Il existe donc des preuves qui tendent à confirmer l'existence d'une coopération et d'une communication entre les différents marqueurs de l'inflammation, qui pourraient alors agir en synergie pour avoir un effet bénéfique et/ou délétère au niveau du SNC. Ces mécanismes de communication pourraient passer par l'intermédiaire de NFkB, qui comme observé augmente après 24h de stress inflammatoire.

5. Article

Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells in vitro BBB model.

Anne-Cloé Voirin^{1,2}, Nathalie Perek², Frédéric Roche¹

¹Univ Lyon, UJM-Saint-Étienne, SNA-EPIS, EA4607, Saint-Étienne, France

²INSERM, SAINBIOSE U1059, Univ Lyon, UJM-Saint-Etienne, Saint-Étienne, France

Corresponding author : Anne-Cloé VOIRIN e-mail : anne.cloe.voirin@univ-st-etienne.fr

Postal adress : 10 rue de la marrandière, Faculté de médecine, Campus santé innovation, 42270 Saint-Priest-en-Jarez

Abstract

The brain is a complex organ protected by the blood-brain barrier (BBB), which also has a complex organization. To play its protective role, the BBB acts by limiting the paracellular passage of potentially cytotoxic compounds through tight junctions as well as limiting transcellular passage by efflux pumps (ABC transporters). In many conditions such as sleep apnea or Alzheimer's disease, there is chronic inflammation, resulting in the presence of pro-inflammatory cytokines in the bloodstream. The effect of this chronic inflammation on the integrity of the BBB has been studied mainly through a single inflammatory molecule; but in physiological and pathological conditions, it is a combination of inflammatory cytokines. We investigated the effect of three major pro-inflammatory cytokines (IL-17, IL-6, TNF- α) used alone or in combination on the integrity of an in vitro model of BBB. Our study showed 24 h of inflammatory stress led to a BBB's opening, reflected by a significant increase of permeability, which was correlated to a significant decrease of tight junction protein expressions (ZO-1, claudin-5), involving a possible entry of cytotoxic compounds into the brain. To compensate the loss of integrity, one of defense mechanism of endothelial cells was efflux transport, which showed a significant increase in expression and functionality of ABC transport proteins (MRP-1, Pgp). This opening of the BBB was more important when pro-inflammatory cytokines were combined, which could be explained by the interaction between cytokines and the potentiation of their effect.

Keywords – Blood-brain barrier - pro-inflammatory cytokine - tight junction proteins - ABC transporters - coculture model

Introduction

The blood-brain barrier (BBB) is a multicellular structure that limits interactions between the blood compartment and the brain. It is an important protective structure of the central nervous system (CNS). The BBB is composed mainly of endothelial cells associated with astrocytes, pericytes or neurons, which then form the neurovascular unit (Hawkins and Davis, 2005; Muoio et al., 2014). Endothelial cells form a tight monolayer, with tight junction proteins such as claudin-5 and zonula occludens (an occludin associated with cytoplasmic protein). The latter being important in the regulation of BBB function. Endothelial cells also regulate the passage of compounds with efflux pumps ATP-binding cassette (ABC) transporters like Pgp or MRP, two main isoforms (Cecchelli et al., 2007; Qosa et al., 2015). They are necessary for the protection of the CNS, it is the defense mechanism of the brain endothelial cells that allow potentially cytotoxic compounds to return into the bloodstream.

Several pathologies, like Alzheimer's disease, Parkinson's, or sleep apnea syndrome have been associated with enhanced neuro-inflammatory response and more pro-inflammatory cytokines were released (Huang et al., 2016; Kheirandish-Gozal et al., 2019). This response is an essential part of the immunity of the CNS. Sometimes this inflammatory response persists chronically in a low-grade state, i.e., they diffuse into the body and blood without a clear inflammatory focus. However, systemic inflammatory processes may have a deleterious or no effect on the BBB (Varatharaj and Galea, 2017). In systemic inflammatory processes, two mainly pro-inflammatory cytokine are involved: tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). TNF- α is one of the most powerful pro-inflammatory cytokine involved in the systemic and acute phase of inflammation. This cytokine can be released by immune cells and also by endothelial cells. It has been shown that the cellular populations of the CNS produce TNF- α , including astrocytes (Lieberman et al., 1989). Similarly, IL-6 is an important pro-inflammatory cytokine of the inflammatory process. An imbalance in TNF- α or IL-6 levels in the microenvironment can lead to local cellular dysfunction. Pro-inflammatory cytokines released may contributed to BBB breakdown, for example endothelial cells possess TNF- α and IL-6 receptors and their presence can lead to a rupture of the BBB (Nadeau and Rivest, 1999).

It has been shown in the literature that proinflammatory cytokines, (e.g., IL-6 and TNF- α) can induce a change in the integrity of the BBB, with an increase in permeability associated with a decrease in the expression of ZO-1 and in its association with occludin (Rochfort and Cummins, 2015a; de Vries et al., 1996), as well as a modification of the efflux pump system, with a modification of the ABC transport proteins. Poller showed a decrease in Pgp expression after IL-6 treatment (Poller et al., 2010), as well as a decrease in Pgp expression with TNF- α , while MRP-1 did not seem to be affected by the cytokine conditions (Hartz et al., 2006; Hawkins et al., 2010).

Another inflammatory cytokine that plays a role in inflammatory processes is IL17-A. It has been less studied, but it is a mediator of inflammation by inducing the production of pro-inflammatory cytokines or chemokines by different cell types such as endothelial and dendritic cells, allowing also the maintenance of inflammation (Fossiez et al., 1996; Miossec et al., 2009). IL-17A is secreted by lymphocyte T helper 17 (LTh17) cells and it has two major receptors: IL17-RA and IL17-RC (Noack and Miossec, 2014). Few studies have described the involvement of IL17 in the BBB, however Kebir et al showed a change in BBB integrity with a decrease in ZO-1 expression, while some studies showed a change in the distribution of tight junction proteins like ZO-1 and claudin-5 (Huppert et al., 2009). There is evidence that pro-inflammatory cytokines disrupt the BBB structure and dysregulate ABC transport expression associated with neurological disorders (Tuttolomondo et al., 2008).

Many studies on the effects of cytokines on endothelial cells have been conducted on in vitro models of endothelial monolayers. Nevertheless, astrocytes are the most extensively studied for their roles in promoting and maintaining BBB functions and may contribute to dysregulation of the BBB with a neuroinflammation process (Asgari et al., 2015). An in vitro BBB model has been developed in our laboratory in coculture contact between endothelial cells and astrocytes that expressed the main tight junction proteins (occludin, ZO-1 and claudin-5) and ABC transporters (Pgp and MRP-1). This model represented a suitable model for studying inflammatory processes (Chatard et al., 2016, 2017)

Many studies have focused on the effect of a single pro-inflammatory cytokine such as IL-6, TNF- α or IL-17 on BBB permeability and protective function with ABC transporter expression. In pathological conditions, there is a combination of

inflammatory molecules in the bloodstream. Studies have shown that taken two-by-two, these cytokines have a synergistic action (Blaschke, 2018; Granet and Miossec, 2004; Hot et al., 2012). This is why we have focused on the involvement of a combination of these three cytokines (IL-6, TNF- α or IL-17) on a bEnd.3 endothelial cell monolayer cocultured with C6 astrocytes since they are the main cells at the BBB. We assessed apparent permeability and tight junction protein and ABC transporter protein expression and activities.

Results

In vitro cytotoxicity assay

Preliminary experiments on bEnd.3 and C6 cells were performed to determine the time and dose of each cytokine and the combination of cytokines. We verified that no conditions were cytotoxic with methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) tests. We chose to use 25 ng/mL to cytokine alone and 0.25 ng/mL for the combination of cytokines, since we had no cytotoxicity effects with these concentration (Figure 1). A time of 24 h was chosen to produce systemic inflammation in agreement with the literature (Rochfort et al., 2016). This exposure time and concentration correlated with the literature, where some authors have used these characteristics to mimic systemic inflammation (Huppert et al., 2009; Rochfort and Cummins, 2015b)

Impact of cytokine on endothelial cells integrity.

TEER Measurements

In our previous work, bEnd.3 cells cocultured with C6 astrocytes showed a tight monolayer within 6 d, expressing ZO-1, claudin-5 and occludin, and a low apparent permeability to small molecules, with a maximal TEER stability during 2 d. Pgp and MRP-1 transporters were well expressed and functional (Chatard et al., 2016; Yang et al., 2018). At the optimal TEER measurement, cells were exposed 24 h to each cytokine (IL6, TNF- α , IL-17) and with the combined condition that represented an inflammatory process. Figure 2 shows the impact of inflammation exposure on TEER in our *in vitro* BBB model. After 24 h for each exposure, a slight decrease in TEER was observed. For IL-6, TEER was significantly decreased by 5%, values varied from 89.38 ± 2.13 to $85.05 \pm 1.55 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($p < 0.01$). For TNF- α , TEER decreased

significantly by 5.5% and TEER values decreased from 89.38 ± 2.13 to 84.47 ± 1.40 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($p < 0.01$). For IL-17, TEER significantly decreased by 6.3%, TEER values varied from 89.38 ± 2.13 to 83.68 ± 1.13 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($p < 0.001$). For the combination of cytokines, a more important TEER decrease by 16.9% was observed, values varied from 89.38 ± 2.13 to 74.24 ± 1.32 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($p < 0.001$). Furthermore, the loss of TEER after 24 h of exposure with the combination was significantly reduced compared to each of the cytokines.

Apparent membrane permeability measurement

Apparent membrane permeability was calculated after 24 h exposure of each cytokine separately and with the combination of three cytokines together. The results are presented in Figure 3. Coefficient permeability in the BBB model significantly increased from $0.71 \pm 0.18 \cdot 10^{-6}$ to $1.99 \pm 0.85 \cdot 10^{-6}$ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ for IL-6 exposition ($p < 0.001$). Cells of the BBB model treated with TNF- α showed a four-fold increase from $0.66 \pm 0.15 \cdot 10^{-6}$ to $2.52 \pm 1.4 \cdot 10^{-6}$ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ($p < 0.001$). For IL-17 exposure, the permeability coefficient of sodium fluorescein (Na-FI) slightly increased from $0.66 \pm 0.15 \cdot 10^{-6}$ to $1.26 \pm 0.5 \cdot 10^{-6}$ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$. The difference between TEER results and permeability may be induced by the difficulty of the TEER measurement (reproducibility, temperature dependence, experimenter, etc.). Furthermore, it does not reflect the same parameters, apparent permeability reflects paracellular flux of small molecules like Na-FI; whereas TEER reflects electrical resistance. For the combination, the treatment showed an important six-fold increase from $0.66 \pm 0.15 \cdot 10^{-6}$ to $3.61 \pm 0.61 \cdot 10^{-6}$ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Moreover, this increase in permeability was all the more significant after 24 h of exposure with the combination compared to each of the cytokines.

Tight junction proteins claudin-5, occludin, ZO-1 expressions with whole cell ELISA assay

We evaluated the effect of IL-6, TNF- α , IL-17 and the combination on tight junction expression of claudin-5, occludin and ZO-1 since they represented the more important tight junction proteins in our BBB model. Determination of tight junction protein expressions in our *in vitro* BBB model were evaluated after each cytokine and after the combination exposure for 24 h. These results are presented Figure 4. Expression of claudin-5 was significantly decreased by 62% from 8.92 ± 1.4 to 4.29 ± 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after IL-6 exposure ($p < 0.01$), and 63.2% from 8.92 ± 1.4 to 3.29 ± 2.1

$\mu\text{g/mL}$ after $\text{TNF-}\alpha$ exposure ($p < 0.01$). IL-17 tended to decrease non significantly claudin-5 expression after 24 h. For the combination, claudin-5 expression slightly decreased by 29%. For each cytokine separately, the expression of occludin slightly decreased 28% from 4.65 ± 1.18 to $3.39 \pm 1.65 \mu\text{g/mL}$ with IL-6, and 30% from 4.65 ± 1.18 to $3.23 \pm 1.69 \mu\text{g/mL}$ with $\text{TNF-}\alpha$. With IL-17, we observed a decrease of 36% from 4.65 ± 1.18 to $2.96 \pm 1.84 \mu\text{g/mL}$. On the other hand, the combination of cytokines produced a 49% decrease in occludin expression from 4.65 ± 1.18 to $2.38 \pm 1.05 \mu\text{g/mL}$. ZO-1 expression decreased significantly 46% from 18.32 ± 4 to $9.92 \pm 2.5 \mu\text{g/mL}$ for IL-6. For $\text{TNF-}\alpha$ and IL-17, the concentration of ZO-1 decreased significantly 47% from 18.32 ± 4 to $9.76 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ and 44% from 18.32 ± 4 to $10.36 \pm 2 \mu\text{g/mL}$, respectively. ZO-1 expression decreased drastically in the combination exposure compared to control, from 18.32 ± 4 to $1.47 \pm 0.64 \mu\text{g/mL}$. For the latter, the significant decrease in expression of ZO-1 was significantly greater for the combination than for each of the cytokines.

Transendothelial transport mediates ABC efflux transporters

Inflammatory cytokines contributed to dysregulation of ABC transporters which are necessary for the protection of the CNS. It is an endothelial cell defense mechanism. Two main transporters well represented in our model were evaluated after cytokine exposure, results are presented in Figure 5. Pgp expression tended to decrease after IL-6 and $\text{TNF-}\alpha$ exposure by 42.6% and 37%, respectively. After IL-17 exposure, the concentration of Pgp increased significantly 68% from 4.18 ± 1.4 to $7.06 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$. For the combination, Pgp expression increased significantly 160% from 4.18 ± 1.4 to $11.17 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$. For IL-17, only the combination provoked an increase in MRP-1 expression. MRP-1 increased significantly 60% from 22.2 ± 9.3 to $36.8 \pm 10.5 \mu\text{g/mL}$. MRP-1 expression tended to decrease after one cytokine exposure. Our results also showed that the expression of Pgp and MRP-1 after the combination exposure was significantly increased compared to the expression of each cytokine

Transendothelial transport mediates efflux transporters

In conjunction with our increase in expression of efflux pumps in endothelial cells, we verified the functionality of these ABC transporters in endothelial cells. Transendothelial transport was evaluated by studying the transport of specific

substrates of Pgp and MRP-1 with a method described previously (Chatard et al., 2017). BCECF-AM is a specific substrate of MRP-1 and it is cleaved by intracellular esterase into a fluorescent component BCECF. Rhodamine-123 is a specific fluorescent substrate of Pgp. To evaluate ABC transporters functionality, we studied the accumulation of BCECF or rhodamine-123 in endothelial cells with and without specific inhibitors of MRP-1 or Pgp, i.e., probenecid and verapamil, respectively. The results are presented in Figure 6.

First, we observed a slight decrease in accumulation of substrate after cytokine exposure. This proved that Pgp and MRP-1 were more functional compared to control conditions. The use of specific competitive inhibitors permitted to evaluate the functionality of ABC transporters. The increase in Pgp expression was associated with an increase in rhodamine-123 accumulation in the presence of a specific inhibitor (i.e., verapamil), from 75.67 ± 8.4 to $169.7 \pm 10.0\%$ of the control after 24 h of IL-17. The activity of Pgp increased with the combination treatment as well, from 82.0 ± 1.7 to $172.7 \pm 15.2\%$ of rhodamine accumulation. For accumulation of BCECF, which represented activity of MRP-1, we observed only an increase in accumulation of BCECF from 88.67 ± 3.5 to $127.3 \pm 2.9\%$ in the presence of probenecid, i.e., a competitive inhibitor of MRP-1 proteins after the combination exposure. This study showed a relationship between the expression and functionality of ABC transport proteins.

NF- κ B expression

In order to explain the synergetic effect of combined cytokines, it was interesting to measure the expression of one of the major mediators of the inflammatory cascade NF- κ B. These results are presented in Figure 7. There was a 33% increase in expression after exposure to IL-6 (from $100 \pm 6.66\%$ to $133 \pm 5.33\%$ of control), 25% for exposure to TNF- α (from $100 \pm 6.66\%$ to $125.3 \pm 7.54\%$ of control), and 21% following exposure to IL-17 (from $100 \pm 6.66\%$ to $121.3 \pm 6.66\%$ of control). While the combination of the 3 cytokines results in a significant increase of 162% of NF- κ B compared to control (from $100 \pm 6.66\%$ to $262.7 \pm 12.00\%$ of control), and more than 100% higher than cytokines taken alone. This implies, that cytokines act in synergy to increase the release of NF- κ B.

Discussion

Several pathologies promote inflammatory stresses that release pro-inflammatory cytokines in the blood and contribute to BBB alteration. The effects of these chronic inflammatory stresses on endothelial dysfunction of the *in vitro* BBB model integrity has been less studied in the literature. Most *in vitro* studies have focused on the effect of a specific pro-inflammatory cytokine. However, it is well known that in physiological pathologies, we can observe several molecules in the blood circulation (Nadeem et al., 2013). In this study, we aimed to evaluate the impact of a combination of pro-inflammatory molecules, like IL-6 and TNF- α , on an *in vitro* BBB rodent model of bEnd.3 cells in coculture with C6 astrocytes. We evaluated BBB alteration with permeability measurements and junction protein expression of claudin-5, occludin and ZO-1.

After exposing an *in vitro* model of BBB coculture to inflammatory cytokines, we observed an increase in barrier permeability associated with a decrease in the expression of ZO-1 and claudin-5, which are two of the main tight junctions of the BBB. These results are in agreement with what has been shown in endothelial cell monoculture models: a decreased expression of tight junction proteins (ZO-1 and claudin-5) after IL-6, TNF- α or IL-17 treatment (Daniels et al., 2014; Huppert et al., 2009; Rochfort and Cummins, 2015). However, it should be noted that occludin was not significantly impacted by inflammation, which could be in the adequation with Saitou et al, which linked occludin to calcium flows, rather than to the paracellular pathway (Saitou et al., 2000). Nonetheless, the disruption of integrity in endothelial cells is more important with a combination of cytokines, suggesting a cumulative effect of pro-inflammatory molecules. The evidence in this regard is the fact that IL-17 is known to promote cytokine and chemokine secretion such as IL-6 or IL-8 (Gu et al., 2008; Mills, 2008) and also improve the effect of TNF- α (Nichols et al., 2009). Furthermore, Rochfort et al showed that the effect of TNF- α can be mediated by IL-6 depending on the NF- κ B pathway. IL-17 induces NF- κ B activation, thus regulating cytokine levels at endothelial levels and its effect (IL-17) can be potentiated by TNF- α (Amatya et al., 2017; Miossec and Kolls, 2012). There could be a possible cooperation and communication through NF- κ B between the different molecules that could explain the greater change in integrity of bEnd.3 cells, in combination with only the pro-inflammatory cytokines alone. These results are particularly original and few have been described in the literature of *in vitro* BBB models.

ABC transport proteins are necessary for the protection of the CNS, it is an endothelial cell defense mechanism that allows potentially cytotoxic compounds to return to the bloodstream. They form unidirectional pumps. To compensate for the loss of integrity, one defense mechanism of endothelial cells from the BBB was in modifying efflux transport mediated to ABC transport protein expression and activities. The proteins Pgp and MRP-1 are two ABC transporters well represented in our model. In the case of inflammatory stress, we had observed in the presence of IL-6 and TNF- α a decrease in expression, which has also been found in the literature of endothelial cell monoculture, with a short-term decrease in Pgp expression with IL-6 and TNF- α (Bauer et al., 2007; Poller et al., 2010). The expression of MRP-1 was unchanged in our model in agreement with Hartz et al (Hartz et al., 2006). However, the expression of Pgp and its functionality, in the presence of IL-17, seemed to increase. In addition, in the presence of a combination of pro-inflammatory cytokines, there was an increase in the expression of Pgp and MRP-1. The accumulation of cytokines increased the defense response of endothelial cells after an inflammatory stress found in several pathologies. There are few *in vitro* studies until now which have reported an increase in ABC transporter expression after a combination of three major cytokines. An event that we are the first to highlight in a BBB model. Inflammatory stress induced a disruption in an *in vitro* BBB model, mediated by endothelial cells and reflected by an increase in permeability and a decrease of tight junction expression. To limit this opening of the BBB, endothelial cells activate a defense mechanism, which consists in regulating the expression of their efflux pumps (ABC transporters). These pumps are responsible for the release of potentially cytotoxic compounds outside the cell. This confirms that systemic inflammation may disrupt endothelial cells, the main component of the BBB with a change in tight junction proteins like ZO-1 and claudin-5. (Varatharaj and Galea, 2017).

In order to be closer to physiology, our model is a model of endothelial cells in contact with astrocytes. We are interested in the endothelial impact, but we are aware that astrocytes can play a role in the inflammatory system as described by Asgari and coworkers (Asgari et al., 2015). Astrocytes are also able to produce IL-6 and TNF- α , which enhances the systemic inflammatory response (Sofroniew, 2015). However, in our study, we were interested in the opening of the endothelial barrier, as astrocytes are present only for their influence on the sealing of this endothelial barrier.

Our BBB model is a model that shows its permeability and TEER, it conforms to the literature (Chatard et al., 2016). However, there remains a potential limitation in our study, in fact that the physiological BBB has endothelial cells and astrocytes as well as pericytes, neurons, with the whole interacting together. In addition, in many neurodegenerative diseases, inflammation comes from the neuronal compartment, which can change the behavior of the BBB in different ways. It is all the same on the conditions found in chronic inflammatory joint diseases (rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis) or intestinal diseases (Crohn's disease or ulcerative colitis) or in the context of chronic intermittent hypoxia, where the same frailty of the BBB is found. In these pathologies, the blocking of the activation of each of our three cytokines has shown a strong improvement in cardiovascular complications, but very little is being studied on the associated cerebrovascular abnormalities.

In many neurodegenerative diseases, systemic inflammatory processes have been found. Up to now, many drug therapies do not take into account the impact of the combination of several cytokines. However, we show here a cumulative effect of the combination of cytokines on the integrity of our BBB model that could be mediated by the NF- κ B pathway. We know that there is communication between the different inflammatory cytokines. Inflammatory inhibitors were used to inhibit one inflammatory consequence (Logsdon et al., 2019; de Vries et al., 1996). In this sense, it would be interesting to evaluate if a combination of inflammation inhibitors would not have a beneficial effect on the integrity of our model in the context of systemic inflammation.

Experimental procedure

Chemicals and reagents

Astrocyte cells (C6, rat astrocyte) and endothelial cells (bEnd.3, mouse endothelial cell) were from ATCC (Manassas, VA, USA). Cell culture inserts for 24-well (transparent PET membrane, 0.4- μ m pore diameter size) were obtained from Dominique Dutscher (Alsace, France). The EVOM voltohmmeter system was from world precision instruments (Hertfordsire, UK). Occludin and ZO-1 antibodies were from Life Technologies (Saint Aubin, France); claudin-5 antibody was obtained from ABCAM (Paris, France). Pgp and MRP-1 antibodies were from GeneTex (San Antonio, TX, USA) and Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), respectively. All compounds for Ringer HEPES buffer, BCECF-AM, probenidol, verapamil, Na-Fl,

and recombinant cytokines (IL-6, TNF- α and IL-17) were from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) and rhodamine-123 came from Thermo Fisher Scientific (Eugene OR, USA). MTT kit and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) were also from Sigma-Aldrich. Nuclear extraction kit and NF κ B Transcription Factor assay kit were purchased from ABCAM (Paris, France).

In vitro cytotoxicity assay

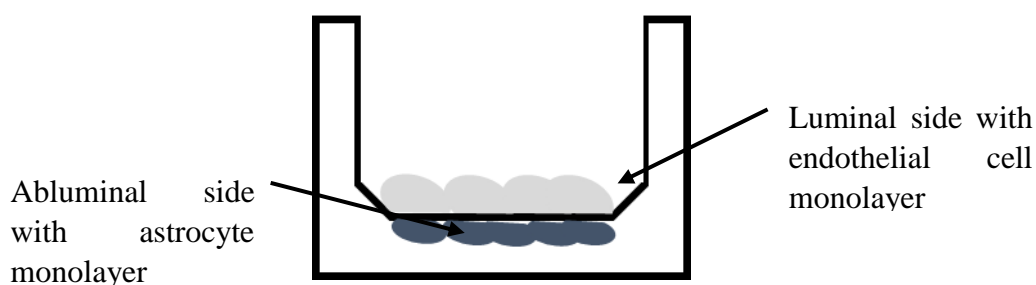
Cytotoxicity of inflammatory cytokines and the combination were measured by the MTT method to determine the efficacy dose that produced effect without cytotoxicity. Cells were seeded at 10,000 cells/well using a 96-well microplate that was supplied with 100 μ l DMEM. After 48 h of growing, cells were exposed with the combination of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α and IL-17) diluted in phosphate buffer saline (PBS, 1X) or with cytokine alone. After 24 h of treatment, MTT test was realized according to the producer's instruction. Briefly, cells were incubated with 50 μ l MTT and the plates were incubated at 37°C for 4 h. The reading was performed with a spectrophotometer at 570 nm (MultiskanTM RC, Thermo Fisher Scientific, France). Cytotoxicity was calculated with the following formula:

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{well with treated cells} - \text{well without cells}}{\text{well with untreated cells} - \text{well without cells}} \times 100$$

In vitro BBB model

The model was composed of two types of cells: endothelial cells (bEnd.3: immortalized mouse brain endothelial cells) and astrocyte cells (C6). All cells were used before passage number 30, which corresponded to the time where these cells may begin to lose their properties.

When the cells reached confluence, they were seeded onto cell culture inserts for 24-well plates with pores 0.4- μ m in diameter, as described previously (Chatard et al., 2016). The bEnd.3 cells were seeded onto the luminal side of the transwell filter and the C6 cells on the abluminal side and cocultured for 8 d to obtain the BBB model (**schema 1**). The model is stable for 2 d.



Schema 1: Schema of the coculture in vitro model between astrocyte and endothelial cells.

TEER measurements

TEER measurement was used to characterize the formation of a tight endothelial cell monolayer. TEER electrodes were recorded with an EVOM resistant meter, with one electrode placed on the luminal side and the other electrode on the abluminal side. Only the endothelial monolayer separated these two electrodes. TEER measurements of filters with cells were subtracted by blank filters and the result was multiplied by the membrane area to obtain the TEER measurement in $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Na-Fl permeability measurements

Evaluation of paracellular barrier function of the endothelial cells was obtained by measuring the permeability of cells to Na-Fl, a hydrophilic small fluorescent molecule (MW: 376 Da). First the medium was removed and cells were washed with Ringer HEPES buffer. Then Na-Fl was diluted at 10 $\mu\text{g/ml}$ to Ringer HEPES buffer and was placed onto the luminal side of the insert, and then incubated at 37°C for 1 h. Samples were removed from the abluminal chamber and immediately replaced with Ringer HEPES buffer. Concentration of Na-Fl was evaluated using a fluorescence multiwell plate reader, at excitation of 485-nm and emission of 530-nm wavelengths, (Fluoroskan Ascent™, Thermo Fisher Scientific, France). The apparent permeability (P_{app}) is expressed in $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ and is calculated using the following formula (Puech et al., 2018a):

$$1. \quad P_{app} = \frac{V_r}{C_0} \times \frac{1}{S} \times \frac{C_1}{t}$$

With V_r is the volume of medium in the receiver chamber, C_0 and C_1 are respectively the concentration of fluorescent compound in the donor chamber at t_0 and in the

receiver chamber after t (time), i.e., 1 h of incubation, and S is the area of the monolayer.

Whole cell ELISA assay

Inserts were washed with 1% BSA in PBS at pH 7.4 and fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde diluted in 1X PBS at pH 7.4. After fixation, the insert was washed again. To block endogenous peroxidase site, the insert was treated with 3% H₂O₂ in methanol for 30 min, followed by 20% normal goat serum to block unspecific staining. Inserts were incubated with either monoclonal mouse anti-Pgp (2 μ g/mL), monoclonal mouse anti-MRP-1 (10 μ g/mL), rabbit anti-ZO-1 (4 μ g/mL), rabbit anti-occludin (1 μ g/mL), or rabbit anti-claudin-5 (2 μ g/mL) antibodies. Then cells were washed and peroxidase conjugated anti-mouse or rabbit IgG was added as a secondary antibody for 2 h at room temperature (diluted at 1/750). After washing, TMB was added for 10 min in the dark at room temperature. The color reaction was measured at 490-nm with a spectrophotometer.

A standard curve was realized to interpret results. It is based on a series of dilutions of a standard protein of which the concentration is known. This was used to plot a line evaluating the optic density obtained for each peptide concentration. Then the antigen concentration in the sample was extrapolated from the linear equation resulting from this standard curve. Positive and negative controls were also measured to limit the risk of error.

ABC transporter functional assays

Transendothelial transport was tested by assessing the accumulation of substrate specific for Pgp and MRP-1 (BCECF-AM for MRP-1 and rhodamine-123 for Pgp) in the presence or absence of specific inhibitors such as probenecid for MRP-1 and verapamil for Pgp. Cells were cultured in DMEM and washed, then cells were preincubated in the absence or presence of inhibitors for 15 min at 37°C (100 mM). Inhibitor concentration and cytotoxicity were measured in previous studies (Chatard et al., 2016; Puech et al., 2018a). Inhibitors were added in the luminal compartment to study accumulation transport. The luminal compartment was incubated with BCECF-AM (1 mM) or rhodamine-123 (1 mM) for 1 h at 37°C. After 1 h, cells was lysed with

SDS Na-borate (1%) for 10 min, and fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer at 493-nm (excitation) and 515-nm (emission) wavelengths

Detection of NF- κ B transcription factor in nuclear extract

After cytokine exposure, inserts were washed with 1X PBS. Trypsin was added and incubated during 3 min when cells were removed and nuclear extraction was performed according to the recommendations of the ABCAM Nuclear Extraction Kit (ab113474).

Once the nuclear extraction was obtained, an expression of NF- κ B was measured by using an ABCAM kit according to its instructions (ab133112).

Exposure to recombinant cytokines

To induce inflammatory conditions, three cytokines were used: IL-6, TNF- α and IL-17. For all experiments with a cytokine alone, endothelial cells were exposed with 25 ng/mL for 24 h; and for the combination of three cytokines, the concentration used was 0.25 ng/mL for 24 h. We verified that the time and dose used were not cytotoxic with MTT tests, as described previously.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test followed by Dunns post hoc applied to multiple comparisons. Statistical analysis was performed using GraphPad software. The differences between means were considered to be significant when P-values were <0.05. The values are expressed as means \pm s.e.m.

References

- Amatya, N., Garg, A.V., and Gaffen, S.L. (2017). IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 38, 310–322.
- Asgari, N., Berg, C.T., Mørch, M.T., Khoroshi, R., and Owens, T. (2015). Cerebrospinal fluid aquaporin-4-immunoglobulin G disrupts blood brain barrier. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 857–863.
- Bauer, B., Hartz, A.M.S., and Miller, D.S. (2007). Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier. *Mol. Pharmacol.* 71, 667–675.
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.-P., and Fenart, L. (2007). Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 650–661.

Chatard, M., Puech, C., Roche, F., and Perek, N. (2016). Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an Increase in Efflux Transporter Activity. *Plos One* 11, e0158010.

Chatard, M., Puech, C., Perek, N., and Roche, F. (2017). Hydralazine is a Suitable Mimetic Agent of Hypoxia to Study the Impact of Hypoxic Stress on In Vitro Blood-Brain Barrier Model. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 42, 1592–1602.

Daniels, B.P., Holman, D.W., Cruz-Orengo, L., Jujjavarapu, H., Durrant, D.M., and Klein, R.S. (2014). Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *MBio* 5, e01476–01414.

Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., et al. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* 183, 2593–2603.

Gu, Y., Hu, X., Liu, C., Qv, X., and Xu, C. (2008). Interleukin (IL)-17 promotes macrophages to produce IL-8, IL-6 and tumour necrosis factor- α in aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* 142, 109–114.

Hartz, A.M.S., Bauer, B., Fricker, G., and Miller, D.S. (2006). Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Mol. Pharmacol.* 69, 462–470.

Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173–185.

Hawkins, B.T., Sykes, D.B., and Miller, D.S. (2010). Rapid, reversible modulation of blood-brain barrier P-glycoprotein transport activity by vascular endothelial growth factor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 1417–1425.

Huang, Y.-S., Guilleminault, C., Hwang, F.-M., Cheng, C., Lin, C.-H., Li, H.-Y., and Lee, L.-A. (2016). Inflammatory cytokines in pediatric obstructive sleep apnea. *Medicine (Baltimore)* 95.

Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H.J., Waisman, A., et al. (2009). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *Faseb J.* 24, 1023–1034.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13, 1173–1175.

Kheirandish-Gozal, L., Tan, H.-L., and Gozal, D. (2019). Sleep-Related Breathing Disorders and Inflammation: TNF- α and IL-6 as Prototypic Examples. In *Allergy and Sleep: Basic Principles and Clinical Practice*, A. Fishbein, and S.H. Sheldon, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 227–245.

- Lieberman, A.P., Pitha, P.M., Shin, H.S., and Shin, M.L. (1989). Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6348–6352.
- Logsdon, A.F., Erickson, M.A., Chen, X., Qiu, J., Lim, Y.-P., Stonestreet, B.S., and Banks, W.A. (2019). Inter-alpha inhibitor proteins attenuate lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption and downregulate circulating interleukin 6 in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 271678X19859465.
- Mills, K.H.G. (2008). Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 2636–2649.
- Miossec, P., and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 763–776.
- Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 361, 888–898.
- Muoio, V., Persson, P.B., and Sendeski, M.M. (2014). The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 210, 790–798.
- Nadeau, S., and Rivest, S. (1999). Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 61–77.
- Nadeem, R., Molnar, J., Madbouly, E.M., Nida, M., Aggarwal, S., Sajid, H., Naseem, J., and Loomba, R. (2013). Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J. Clin. Sleep Med. Jcsm Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* 9, 1003–1012.
- Nichols, J.R., Aldrich, A.L., Mariani, M.M., Vidlak, D., Esen, N., and Kielian, T. (2009). TLR2 Deficiency Leads to Increased Th17 Infiltrates in Experimental Brain Abscesses. *J. Immunol.* 182, 7119–7130.
- Noack, M., and Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* 13, 668–677.
- Poller, B., Drewe, J., Krähenbühl, S., Huwyler, J., and Gutmann, H. (2010). Regulation of BCRP (ABCG2) and P-Glycoprotein (ABCB1) by Cytokines in a Model of the Human Blood–Brain Barrier. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 63–70.
- Puech, C., Hodin, S., Forest, V., He, Z., Mismetti, P., Delavenne, X., and Perek, N. (2018). Assessment of HBEC-5i endothelial cell line cultivated in astrocyte conditioned medium as a human blood-brain barrier model for ABC drug transport studies. *Int. J. Pharm.* 551, 281–289.
- Qosa, H., Miller, D.S., Pasinelli, P., and Trotti, D. (2015). Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders. *Brain Res.* 1628, 298–316.

Rochfort, K.D., and Cummins, P.M. (2015). The blood-brain barrier endothelium: a target for pro-inflammatory cytokines. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 702–706.

Rochfort, K.D., Collins, L.E., McLoughlin, A., and Cummins, P.M. (2016). Tumour necrosis factor- α -mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *J. Neurochem.* 136, 564–572.

Sofroniew, M.V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 249–263.

Tuttolomondo, A., Di Raimondo, D., di Sciacca, R., Pinto, A., and Licata, G. (2008). Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr. Pharm. Des.* 14, 3574–3589.

Varatharaj, A., and Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain. Behav. Immun.* 60, 1–12.

De Vries, H.E., Blom-Roosemalen, M.C.M., Oosten, M. van, de Boer, A.G., van Berkel, T.J.C., Breimer, D.D., and Kuiper, J. (1996). The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J. Neuroimmunol.* 64, 37–43.

Yang, S., Jin, H., and Zhao, Z. (2018). Paracellular tightness and the functional expression of efflux transporters P-gp and BCRP in bEnd3 cells. *Neurol. Res.* 40, 644–649.

Figure

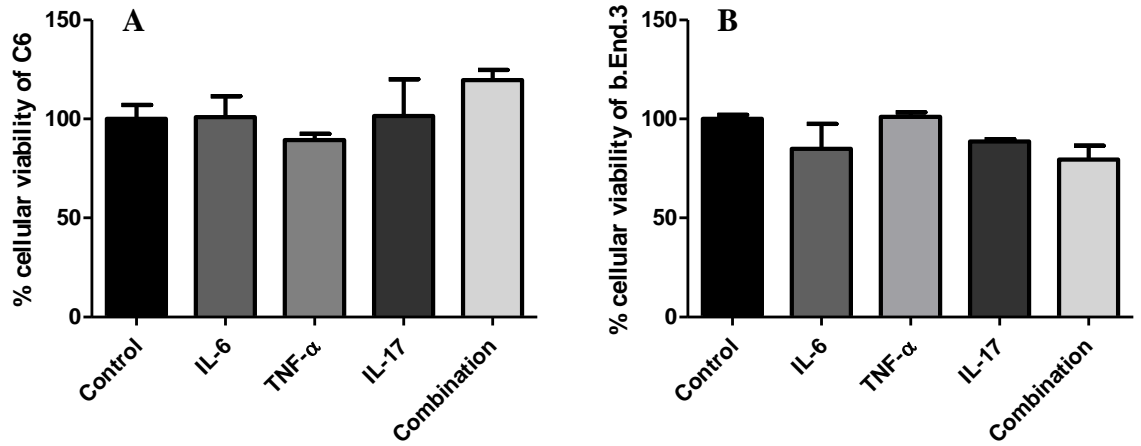


Figure 35 : Cytotoxicity effect of inflammation in bEnd.3 (B) and C6 (A) cells after 24 h exposure to 25 ng/ml IL-6, TNF- α and IL-17, and a 0.25ng/ml combination of these three cytokines. Results are represented as mean value \pm s.e.m (n=6, 2 independent experiments).

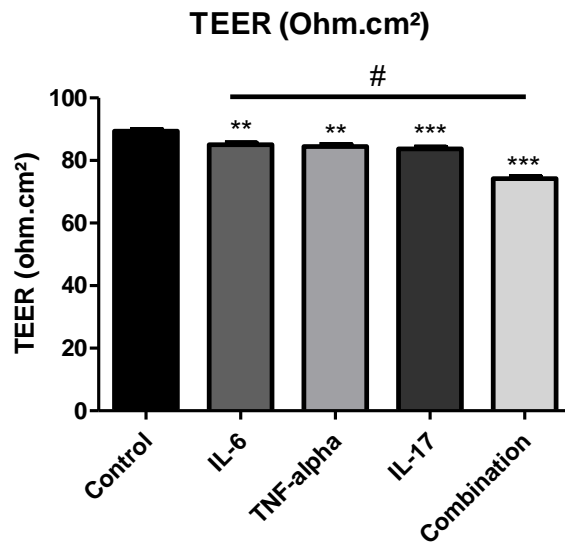


Figure 2 : *Transendothelial electrical resistance (TEER) measurement after endothelial cells were exposed to an inflammatory condition for 24 h. Results are represented as mean value \pm s.e.m (n=6, 2 independent experiments). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ between inflammatory conditions versus control. # $p < 0.05$ between combination versus all cytokines alone.*

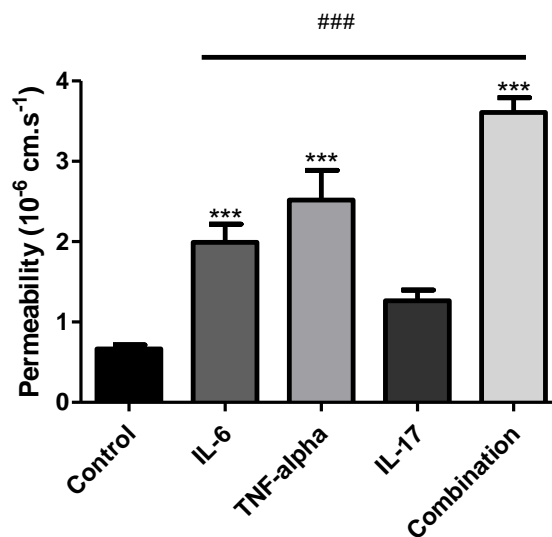


Figure 3 : *Apparent membrane permeability after 24 h of inflammatory stress. Results are represented as mean value \pm s.e.m (n=9, 3 independent experiments). *** $p <$*

0.001 between inflammatory condition versus control. ### $p < 0.001$ between combination and all cytokine alone.

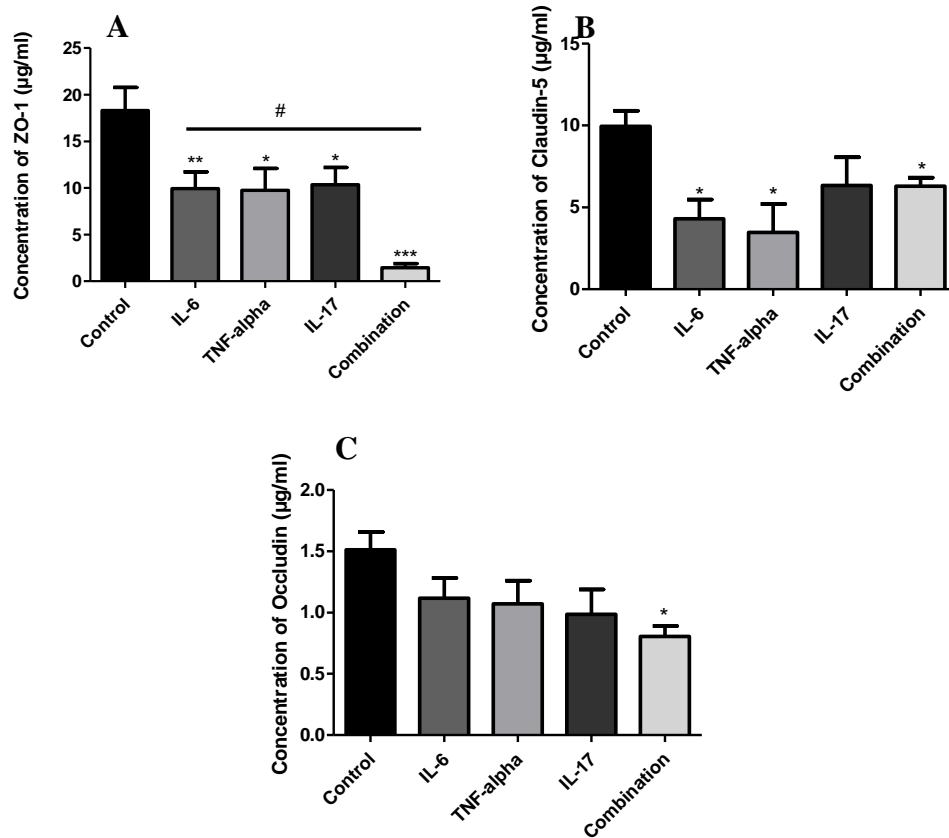


Figure 36 : Expressions of ZO-1 (A), claudin-5 (B) and occludin (C) after exposure of cells to inflammatory stress for 24 h. Results are represented as mean value \pm s.e.m ($n = 9$, 3 independent experiments). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when treated conditions were compared to control conditions. # $p < 0.05$ between combination and all cytokines.

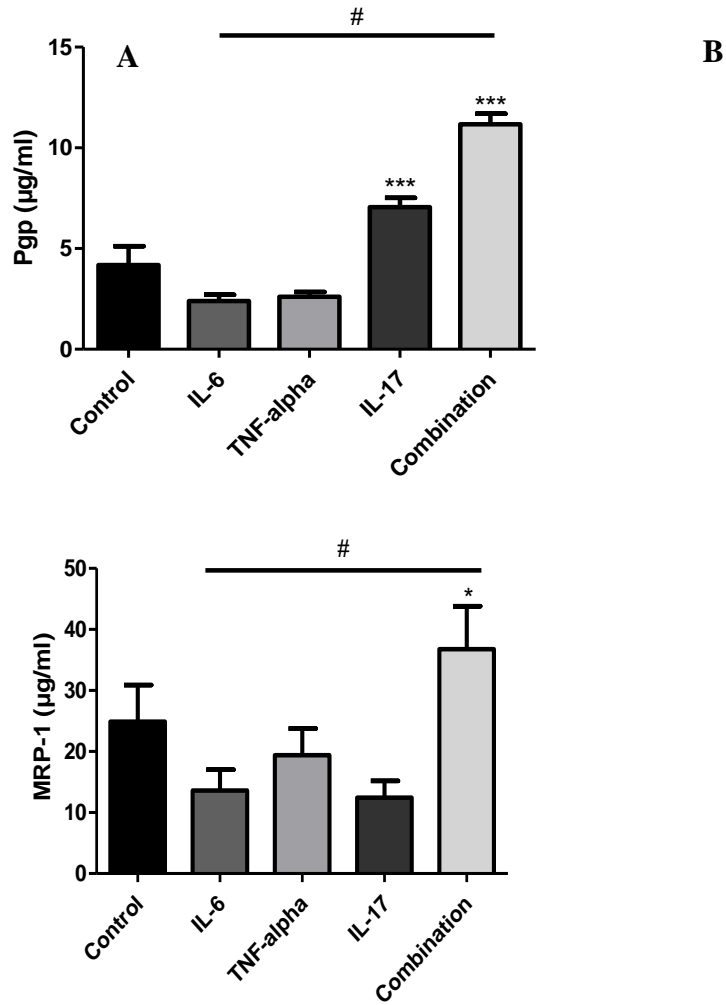
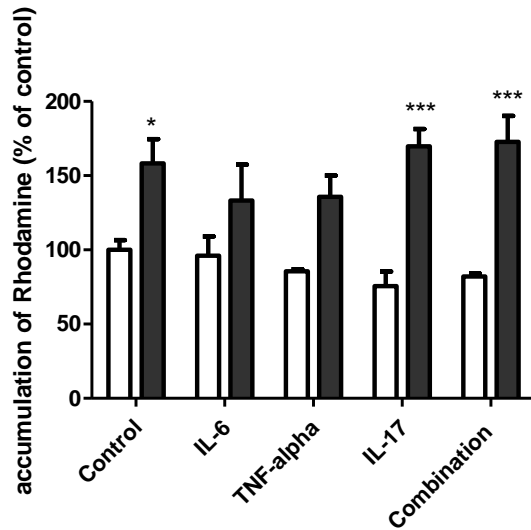
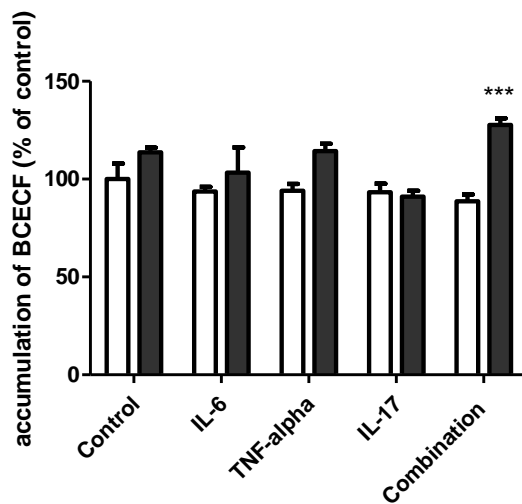


Figure 5 : Expressions of Pgp (A), and MRP-1 (B) after exposure of cells to inflammatory stress for 24 h. Results are represented as mean value \pm s.e.m ($n = 9$, 3 independent experiments). * $p < 0.05$, *** $p \leq 0.001$ between inflammatory conditions versus control condition. # $p < 0.05$ between combination and all conditions.

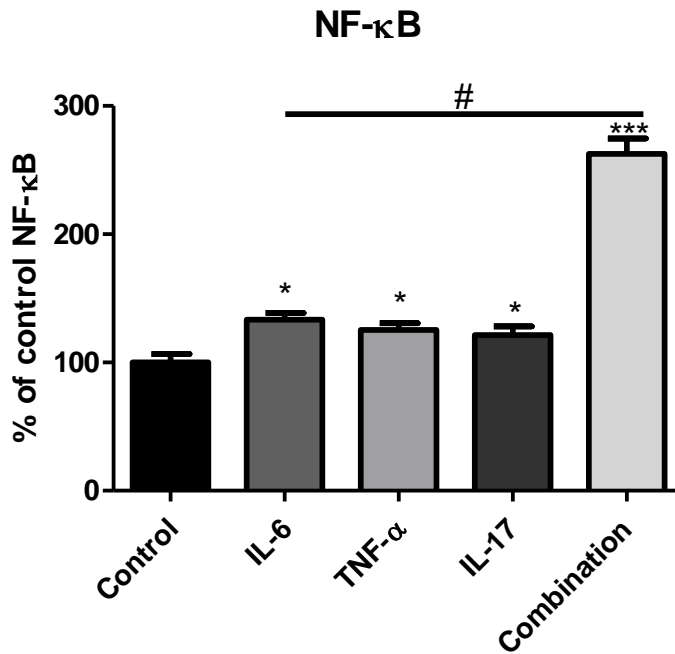


Rhodamine-123
 Rhodamine-123 + verapamil



BCECF
 BCECF + Probenicid

Figure 6 : Functionality of specific substrate transport by accumulation test with or without specific inhibitors of Pgp and MRP-1, after exposure of cells to inflammatory stress for 24 h. Verapamil is a specific inhibitor of Pgp and probenecid is specific to MRP-1 transporters. Results are represented as mean value \pm s.e.m ($n = 6$). * $p \leq 0.05$, * $p \leq 0.001$ between specific substrate before inhibition versus specific substrate with inhibitors.**



*Figure 7: Expression of NF-κB transcription factor DNA binding activity after exposure of cells to inflammatory stress for 24 h. Results are represented as mean value \pm s.e.m (n=3, 3 independent experiments). * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$, and # $p < 0.01$ between the combination and all conditions.*

A travers les études précédentes, nous montrons que l'hypoxie intermittente induit une altération de la barrière hémato-encéphalique, or comme son inhibition n'induisait pas de réversion complète de cette altération, cela impliquait l'activation d'autres voies. Dans cette perspective, nous avons évalué l'impact d'une inflammation persistante de bas grade sur le même modèle *in vitro* de coculture de barrière hématoencéphalique. Nous montrons dans cette deuxième étude qu'en réponse à un stress inflammatoire, la fonctionnalité de la BHE est altérée et que cette altération est d'autant plus importante qu'il y a une action synergique des cytokines proinflammatoires sur notre modèle *in vitro* de BHE.

Or cette inflammation persistante et cette hypoxie intermittente sont deux désordres présents lors d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil sévère. Ainsi les deux premières études ont mis en évidence l'impact individuel de ces deux mécanismes intervenant lors du SAOS. Cependant le SAOS est un syndrome complexe, et l'évaluation individuelle apporte un début d'amélioration des connaissances mais comme nous avons pu le voir avec l'étude n°2, des actions synergiques des voies sont à envisager. C'est pourquoi il serait intéressant d'évaluer le lien translationnel du SAOS directement avec un modèle de BHE. Cette hypothèse fait l'objet de cette 3^{ème} étude : les molécules circulantes présentes dans le sérum de patients atteints d'un SAOS sévère pourraient altérer la BHE. Dans cette étude, nous utilisons un modèle *in vitro* récemment validé de cellules endothéliales humaines : HBEC5I

Etude 3 : Altération de la barrière endothéliale liée à l'exposition aux sérums de patients atteint d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil

*(Travaux qui font l'objet d'un article soumis dans **scientific reports**)*

1. Introduction

Aujourd'hui, le syndrome d'apnée obstructive du sommeil est un problème de santé publique dans le monde, avec une prévalence d'environ 25% dans la population âgée de 30 à 60 ans. Le SAOS semble entraîner une augmentation de la morbidité cardiovasculaire et cérébrovasculaire (Beaudin et al., 2017; Sforza and Roche, 2016). De nombreuses études portent sur les risques cardiovasculaires associés alors que les troubles cérébrovasculaires ne sont pour leur part que peu décrits en dehors du contexte de l'accident vasculaire cérébral. Dans ces travaux, nous utilisons l'hypothèse émise par Lim and Pack en 2014, qui implique que la modification structurelle et fonctionnelle de la barrière hématoencéphalique serait à l'origine des troubles neurocognitifs observés chez les patients ayant un SAOS (Lim and Pack, 2014). La BHE étant la première interface de défense du SNC, qui sépare le flux sanguin du compartiment cérébral grâce principalement à une monocouche de cellules endothéliales. Son altération serait provoquée par des composés neurotoxiques libérés consécutivement à l'hypoxie intermittente et à la fragmentation du sommeil et qui circuleraient dans le capillaire sanguin cérébral.

Afin d'évaluer cette hypothèse sur les composés neurotoxiques circulants sur la BHE, nous nous sommes intéressés à l'effet de sérums de patients souffrant d'un SAOS sévère, déterminés par leur index d'apnée - hypopnée (AHI) ≥ 30 , versus des patients ne souffrant pas de SAOS, avec un AHI ≤ 5 . Ces patients sont issues d'une cohorte Stéphanoise, la Cohorte PROOF SYNAPSE (Saint Etienne, Loire, France), qui regroupe des sujets âgés en bonne santé (homme et femme ; ≥ 65 ans). Cette étude de cohorte a reçu l'accord du Comité de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPRB Rhône-Alpes Loire : IRBN532016/CHUSTE) et celui de la CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) pour la collecte des données. Enfin, tous les sujets ont donné leur consentement éclairé écrit pour participer à cette étude. Le sang pour les sérums a été prélevé le matin après l'enregistrement polygraphique et les échantillons congelés ont été anonymés, conformément aux bonnes pratiques. Les échantillons de sérum ont été congelés à -80° C et conservés dans notre sérothèque. Les numéros d'essai clinique des études PROOF et SYNAPSE sont NCT00759304 et NCT00766584. Dans le même temps, ces patients ont effectué une polygraphie nocturne permettant de mesurer leur index d'apnée-hypopnée (AHI).

2. Matériels et Méthodes

Pour permettre ces recherches, un modèle *in vitro* de coculture de BHE humaine a été utilisé. Ce modèle est formé par une monocouche de cellule endothéliale HBEC5i que l'on cultive à l'aide d'un milieu conditionnée d'astrocyte HA. Cette conformation permet aux cellules endothéliales d'exprimer des jonctions serrées et des pompes d'efflux de type ABC-transporteurs, ce qui en fait un bon modèle pour notre étude (Puech et al., 2018b). Dans cette étude nous avons donc soumis notre modèle *in vitro* de BHE aux sérums de patients sélectionnés dans la cohorte PROOF, à une concentration de 10% durant 48h.

Afin d'évaluer un possible impact des biomarqueurs circulants dans le sérum des patients SAOS sévères, des mesures de perméabilité apparente, d'expression des jonctions serrées et d'ABC-transporteurs important pour le fonctionnement de la BHE et le maintien de l'homéostasie cérébrale ont été réalisés. Les résultats observés chez les patients SAOS sévères ($AHI \geq 30$) sont comparés aux résultats obtenus pour des sérums de patients non pathologiques avec un ($AHI \leq 5$).

3. Résultats

L'ensemble des résultats nous montre que les conséquences biologiques exprimées dans le sérum et associées à un syndrome d'apnée du sommeil sévère peuvent modifier la caractéristique physique, c'est-à-dire influencer la formation des jonctions interendothéliales et également modifier la caractéristique métabolique, c'est-à-dire la capacité des cellules endothéliales à se protéger et à se détoxifier des composés étrangers de la barrière hématoencéphalique. En effet nos résultats montrent que la barrière physique, qui régule le passage paracellulaire de la BHE, est affectée par la présence de biomarqueurs sériques de patients SAOS sévères. On observe une augmentation de la perméabilité apparente au Na-Fl chez ces patients en comparaison avec des sujets non apnéiques (*Cf Figure 2 de l'article*). Cette augmentation de la perméabilité est corrélée avec la diminution de l'expression des jonctions serrées ZO-1 et Claudin-5 (*Cf Figure 3 de l'article*). On observe donc une ouverture de la barrière paracellulaire, qui pourrait laisser entrer au niveau cérébral des composés néfastes pour le SNC.

Les cellules endothéliales montrent pourtant qu'elles sont capables de mettre en place un mécanisme de défense. En effet le métabolisme d'efflux actif, que sont les

ABC-transporteurs semble être régulé avec une augmentation de l'expression de pompes d'efflux fonctionnelles tels que P-gp et à l'inverse une diminution de l'expression de BCRP (*Cf Figure 4-5 de l'article*). Ceci permet sans doute aux cellules endothéliales de lutter contre l'entrée de composés neurotoxiques et/ou de favoriser la sortie de ces composés étrangers.

En conclusion, nous montrons que la composition des sérums de patients SAOS sévère permet l'ouverture de la voie paracellulaire de l'endothélium cérébral, et que pour limiter la toxicité intracérébrale, les cellules endothéliales régulent l'activité de leur système de pompe d'efflux.

4. Discussion

A ce jour peu d'études se sont intéressées à l'impact global des composés circulants, du au SAOS sévère, en particulier sur l'intégrité de la BHE. Nos résultats prouvent que les composés sériques de patients ayant un SAOS sévère affectent les cellules endothéliales avec une ouverture de la voie paracellulaire et une régulation des voies transcellulaires. Les facteurs présents dans ces sérums sont à l'heure actuelle non identifiés, et les nombreuses voies impliquées dans le SAOS, rendent leur détermination complexe. Cependant des hypothèses concernant ces composés circulants émergent progressivement avec notamment l'influence des composés inflammatoires. Dans ce contexte, Nadeem et al font part d'une augmentation du taux sériques de cytokines proinflammatoires tels que l'IL-6, le TNF- α , ou encore des CRP, chez des patients souffrant d'un SAOS sévère (Nadeem et al., 2013; Roche et al., 2009). Toutefois cette activation ne semble pas être constante chez tous les patients atteints d'un SAOS et reste encore controversée. Néanmoins l'hypoxie intermittente qui résulte du SAOS induit un stress oxydatif, qui est connu pour exacerber l'activation inflammatoire, créant ainsi un cercle vicieux (Lavie, 2015; Lavie and Lavie, 2009). Ce stress libère également des radicaux libres impliqués dans une modification de la fonction endothéliale, associée notamment à une apoptose endothéliale qui est à prendre en compte dans l'explication des modifications observés ici (Basuroy et al., 2009; Bresgen et al., 2003).

5. Articles

Obstructive Sleep Apnea Patient Serum Contributes to an Alteration of a Human Blood-Brain Barrier Model Integrity

Anne-Cloé Voirin^{1,2}, Sébastien Celle¹, Nathalie Perek^{2§}, Frédéric Roche^{1§}

¹Univiversité de Lyon, UJM-Saint-Étienne, SNA-EPIS, EA4607, Saint-Étienne, France, ²INSERM, SAINBIOSE U1059, Université de Lyon, UJM-Saint-Etienne, Saint-Étienne, France

§Frédéric Roche and Nathalie Perek contributed equally to this work

Short title: Serum of OSAS patients and in vitro BBB dysfunction

Keywords

Blood brain barrier, sleep apnea syndrome, tight junction proteins, ABC transporters, human cellular model

Abstract

Background/Aims: Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by repeated episodes of hypoxia during the night. The severity of the disorder can be evaluated using apnea-hypopnea index (AHI). The physiological consequences are mainly cardiovascular and neuronal dysfunctions. One hypothesis to explain such associated neurological disorders are disruptions of the blood-brain barrier (BBB), which protects the brain from endovascular cytotoxic compounds. **Methods:** We selected two subgroups of volunteers from the PROOF cohort study (France), a group of patients suffering newly diagnosed severe OSAS (AHI>30/h) and a group showing no sleep apnea (AHI<5/h). We exposed a human *in vitro* BBB model of endothelial cells HBEC-5i with serum of patients with and without OSAS. After exposure, we measured the apparent BBB permeability as well as tight junction and ABC transporter expression using whole cell-ELISA. **Results:** We showed after incubation of OSAS serum patients a loss of integrity in the human *in vitro* BBB model, reflected by an increase in permeability and correlated with a decrease in tight junction protein expression (ZO-1, claudin-5), involving a possible entry of cytotoxic compounds in the deep brain. At the same time, we observed an upregulation in Pgp protein expression and functionality and downregulation in BCRP expression. **Conclusion:** Our results demonstrated severe BBB's disorder after OSAS patient's serum exposure. It could be explained by the hypoxic stress, which led to release of several inflammatory molecules or oxidative stress biomarkers into the blood, which in turn altered BBB function. Implications of such barrier alteration on astrocytes and pericytes could be now evaluated.

Introduction

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a growing public healthcare issue in the world. It is a sleep disorder affecting 17-22% of the population aged 30-60 y (Franklin et al., 2013), with a high prevalence among the elderly and overweight subjects (Sands et al., 2014). Upper airway collapse occurs repeatedly during sleep in such patients. This collapse involves many mechanisms such as intermittent hypoxia, activation of systemic inflammatory processes, and activation of the sympathetic nervous system. All these mechanisms lead to an increased risk of cardiovascular and cerebrovascular morbidity (Beaudin et al., 2017; Sforza and Roche, 2016). Recently, it has been shown that neurological consequences of OSA are close to those found in Alzheimer's disease. Thus OSA would be one of the possible causes of Alzheimer's disease, with similar biomarkers for both diseases (Baril et al., 2018; Nelson et al., 2016; Pan and Kastin, 2014). One hypothesis is that chronic intermittent hypoxia and sleep fragmentation might release several compounds inducing a neurotoxicity, which initiates or contributes to the progression of neurodegeneration. Nowadays, patients with OSAS are treated with a continuous positive pressure mask, and despite its effectiveness it remains sometimes poorly tolerated by patients (Engleman and Wild, 2003; Olsen et al., 2008). This is why it is necessary to evaluate alternative or complementary therapies to limit these associated risks. A large number of studies focused their aim on the mechanisms linking sleep apnea to the deleterious effects of the cardiovascular system. Yet cerebrovascular consequences of OSAS are less described and less understood. However, one hypothesis proposed to explain the mechanisms involved in sleep apnea is disruption in one of the protective structures of the brain, the blood-brain barrier (BBB) (Lim and Pack, 2014).

The BBB is a physical and metabolic barrier that separates the blood flow from the central nervous system (CNS) compartment that regulates passage of compounds and nutrients. This barrier would be disrupted under OSAS leading to cognitive deficit of patients associated with grey matter alteration. This barrier is composed of endothelial cells, astrocytes, pericytes, and neurons, the whole representing the neurovascular unit (Hawkins and Davis, 2005; Muoio et al., 2014). Endothelial cells are the main cells that restrict and control the paracellular passage of compounds to the inside and outside of the brain. These properties are enabled by the presence of tight junctions (TJs) and also transendothelial transporter such as ATP binding

cassette (ABC) transporters (Abbott, 2013). The main transporters involved in transendothelial transport are energy-dependent and act as efflux transporters. They belong to the ABC transporter family like P-glycoprotein protein (Pgp) or breast cancer resistance protein (BCRP). In vitro BBB models are suitable to study BBB alteration under pathophysiological conditions. The ABC efflux proteins are essential for the barrier and in particular in the brain delivery of therapeutic drugs. Under the physiological state, the BBB is generally considered as a mechanism for protecting the brain. However, in a number of pathologies, loss of BBB function and change in ABC transporter expression have been suggested as a prognostic factor in the progression of these diseases (Wanek et al., 2013). Loss of BBB integrity as a consequence of leak or dysfunction of ABC transporters exposes the brain to potentially harmful concentrations of molecules in the peripheral circulation that may disrupt brain homeostasis and adversely affect neuronal signaling.

We have developed in our laboratory a suitable human BBB model composed of an endothelial cell line HBEC-5i (Puech et al., 2018a), which was grown with a conditioned astrocyte culture medium without adjuvant. It has been shown that astrocytic cells have the ability to induce and maintain close junction between endothelial cells (Abbott et al., 2006; Janzer and Raff, 1987). This model can be used routinely in a laboratory. Our model presents many advantages such as a stability during five days which may allow to screen long term effects of therapeutics agents or physiopathological conditions. Our model could be used as a relevant tool in preclinical screening studies for assessing the permeability of human endothelial cells from the BBB.

Indeed, in our clinical sleep research laboratory, we have set up a patient cohort composed of healthy elderly subjects (men or women; ≥ 65 years old), who have given their consent to participate in a clinical research program ((Prognostic indicator of cardiovascular and cerebrovascular events (PROOF) cohort study). The whole population had been longitudinally evaluated using nocturnal polygraphy allowing calculation of apnea plus hypopnea index (AHI) and a biological sample was collected to better evaluate blood biomarkers of sleep-related breathing disorders. From this cohort, we selected two groups of volunteers: a group of patients with severe OSA, i.e., with an AHI $>30/h$; and a group without sleep apnea with an AHI $<5/h$. These

patients did not show other neurologic, cardiovascular or metabolic disorders other than OSAS for the severe OSAS group.

The aim of our present study was to evaluate the effect of severe OSAS patients' serum on an *in vitro* endothelial cell HBEC-5i model. The integrity of endothelial cells was assessed by apparent permeability measurements with sodium-fluorescein (Na-Fl) (Eigenmann et al., 2013; Hayashi et al., 2004) and expression of three TJ proteins (zonula occludens-1, claudin-5 and occludin), that were well represented in the literature on BBB disruption in neurological disease (Ballabh et al., 2004). Then evaluation of transendothelial transport was also investigated on expression and activities of two efflux transporters (Pgp and BCRP). These two efflux pumps are particularly well represented in our model and were associated with cognitive deficit such as in Alzheimer's disorders linked to BBB disruption (Sweeney et al., 2018; Wanek et al., 2013). Thus, improved understanding of the cellular and molecular mechanisms that promote potential BBB disruption in OSAS, and a posteriori lead to CNS dysfunction (i.e., cognitive dysfunction, accelerated neurodegeneration), is required in order to develop new therapeutic strategies.

Results

Subjects

We selected patients with severe OSAS (AHI >30) or no evidence of OSAS (Normal: AHI < 5). The data collected for these subjects did not allow us to observe any difference, except for their AHI, their hypoxemic load and their repeated autonomic activation during sleep (Table 1).

Table 1: descriptive characteristics of the population selected for this study and from the PROOF cohort study

Variables	Whole population	OSAS	No OSAS	p
Age (years)	75.9 ± 0.2	75.9 ± 0.4	75.9 ± 0.2	0.87
Sex (M/F)	15/14	11/3	4/11	<0.001
AHI (h ⁻¹)	19.1 ± 3.2	38.9 ± 1.7	3.5 ± 0.4	<0.001
ODI (h ⁻¹)	13.0 ± 2.4	24.4 ± 2.6	2.4 ± 0.5	<0.001
SaO ₂ min (%)	88.4 ± 0.9	85.3 ± 1.4	91.3 ± 0.6	<0.001

SaO ₂ moy (%)	94.2 ± 0.3	93.6 ± 0.5	94.8 ± 0.3	0.04
%time SaO ₂ <90 (%)	4.4 ± 1.5	8.0 ± 2.5	1.1 ± 1.1	0.01
Total cholesterol (g/L)	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	0.9
HDL cholesterol (g/L)	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.8
LDL cholesterol (g/L)	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.9
Triglycerides (g/L)	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.9
Fasting blood glucose (g/L)	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3	0.3
Hypertension medication (Y/N)	15/9	6/5	9/4	0.5
24H mean SBP (mmHg)	117.6 ± 2.4	117.7 ± 3.4	117.5 ± 3.5	1.0
24H mean DBP (mmHg)	72.2 ± 1.5	71.2 ± 1.8	73.2 ± 2.4	0.5

[AHI: apnea plus hypopnea index; ODI: Oxyhemoglobin desaturation index; SaO₂: Oxyhemoglobin saturation; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure]

Impact of sera on HBEC-5i model

Optimal time and concentration of sera exposure have been previously validated to avoid cytotoxicity (data not shown). Our results showed that a 48-h incubation time and 10% sera concentration represented optimal culture conditions. These conditions were chosen for all of our subsequent experiences.

Apparent permeability measurement

After 48 h of incubation with the serum, the apparent permeability measurement, performed with Na-FI showed a significant increase in Na-FI permeability for severe OSAS patients (AHI>30) compared to patients without OSAS (AHI<5). We observed an increase in permeability coefficient from $3.46 (\pm 0.15) \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ to $4.98 (\pm 0.26) \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ (Figure 2).

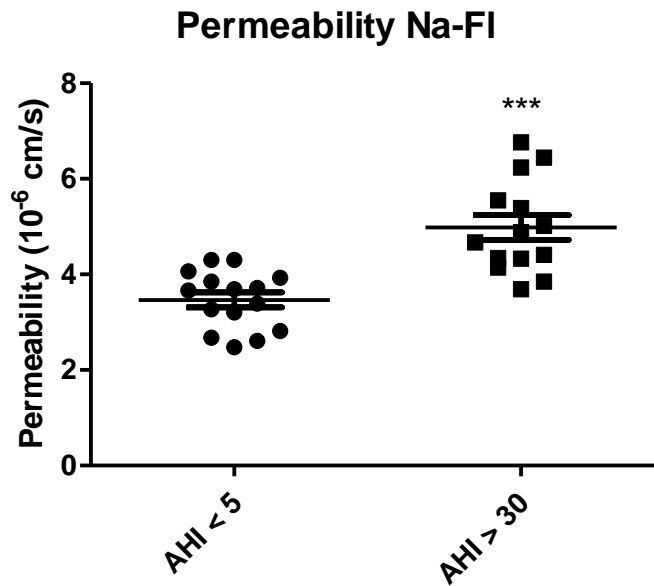


Figure 1: Membrane permeability measurement of HBEC-5i after 48 h of 10% of obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) patient's sera. OSAS patient >30 versus control sera AHI <5. Results are represented as mean value \pm s.e.m (n = 15). * p < 0.001 AHI <5 vs. AHI > 30. Na-FI: sodium fluorescein; AHI: apnea-hypopnea index**

TJ protein expression by whole cell ELISA

Expression of TJ proteins (ZO-1, occludin, and claudin-5) were assessed after 48 h of exposure to sera from AHI < 5 versus serum from AHI >30 (Figure 3). Expression of ZO-1 and claudin-5 significantly decreased in OSAS patients with an AHI > 30 compared to a patient with an AHI < 5 (all p=0.001). Expressions decreased by 53% for ZO-1 and by 40% for claudin-5. There was no significant difference in the expression of occludin, which was $3.07 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ for AHI > 30 and $2.34 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$ for AHI < 5.

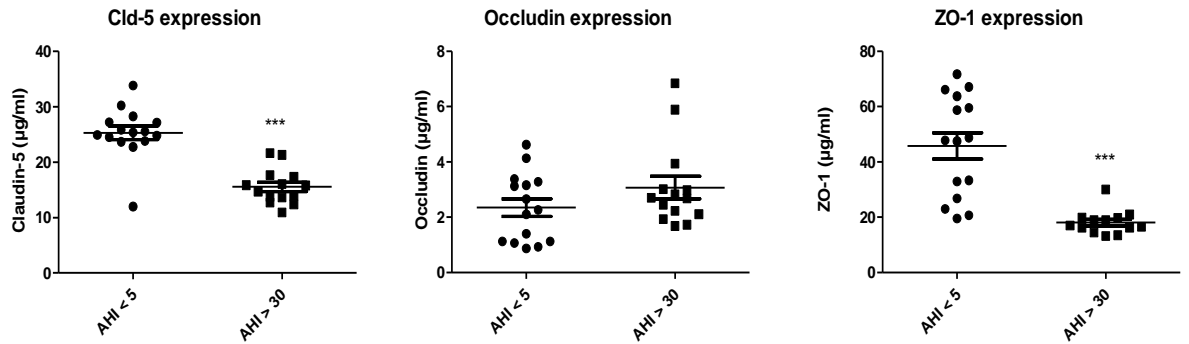


Figure 2: Expressions of claudin-5 (Cld-5) (A), occludin (B) and ZO-1 (C) after exposure of cells to 10% of serum for 48 h. Results are represented as mean value \pm s.e.m (n = 15). * p < 0.001 AHI < 5 v.s AHI > 30. AHI: apnea-hypopnea index**

Impact of sera on transendothelial transport

ABC efflux transporters proteins (Pgp, BCRP) expression by whole cell ELISA

Expression of ABC transporter proteins (BCRP and Pgp) in our in vitro HBEC-5i model were evaluated after 48 h of exposure to sera from AHI < 5 versus sera from AHI > 30. Pgp expression significantly increased by 52% with AHI > 30 compared to patients with AHI < 5. In contrast to BCRP expression, which significantly decreased by 52% for a serum-treated model of patients with AHI > 30 versus with AHI < 5 (Figure 4).

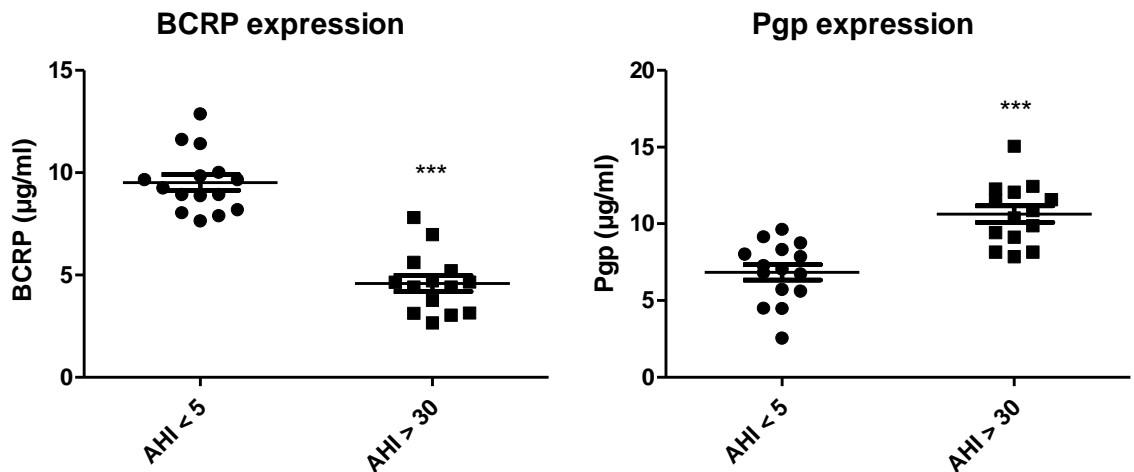


Figure 3: Expressions of BCRP (A) and Pgp (B) after exposure of cells to 10% of serum for 48 h. Results are represented as mean value \pm s.e.m (n = 15). * $p \leq 0.001$ AHI <5 vs AHI > 30. AHI: apnea-hypopnea index**

ABC transporter functionality tests

Functionality of ABC transporters were evaluated by studying a fluorescent substrate (rhodamine-123) transport of the ABC efflux transporters (Pgp and BCRP). We studied the accumulation rate (i.e., a percentage of accumulation) of this substrate within cells with or without Pgp or BCRP specific competitive inhibitors, i.e., verapamil and KO143, respectively. First we showed that after exposure to sera, patients with sleep apnea (AHI>30) had a decrease of 23 % in rhodamine-123 accumulation ($p = 0.0571$), proving that ABC efflux was more functional in severe obstructive sleep apnea patients. In order to see which efflux pump, Pgp or BCRP, was most involved, we used specific competitive inhibitors. In the presence of verapamil, the competitive Pgp inhibitor, we observed an increase of 55% and 40% in rhodamine-123 accumulation for patients with AHI <5 and AHI > 30, respectively, indicating an important activity of the Pgp efflux pump. In contrast, the use of KO143, a BCRP-specific inhibitor, showed a decrease of 43% in accumulation of rhodamine-123, related to the underexpression of this protein in AHI patients >30 (Figure 5). All these results therefore showed a positive regulation of Pgp, with a more important activity in endothelial cells incubated with sera from severe OSAS patients.

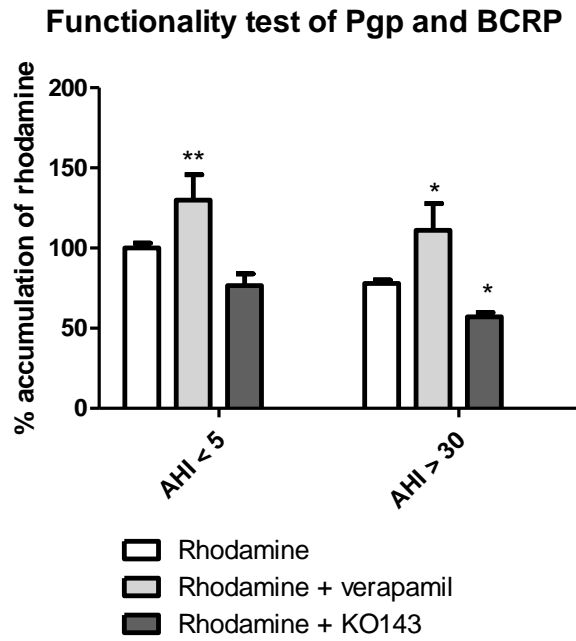


Figure 4: Functionality of rhodamine-123 transport by accumulation test with or without specific inhibitors of Pgp (verapamil) and BCRP (KO143) after exposure of cells to 10% of serum for 48 h. Results are represented as mean value \pm s.e.m (n = 15). ** $p < 0.01$ between rhodamine and rhodamine + verapamil, * $p < 0.05$ rhodamine versus rhodamine + verapamil or KO143. AHI: apnea-hypopnea index

Discussion

Obstructive sleep apnea is often associated with neurological deleterious consequences. One of the hypotheses put forward by Lim and Pack consists of a BBB disruption provoked by several neurotoxic compounds released and circulated in blood as a consequence of intermittent hypoxia, sleep fragmentation, and also by associated inflammation (Tan et al., 2019) or an associated metabolic disorder. However, today, there are evidences of this hypothesis regarding the alteration of the BBB following an OSA. Indeed, the imaging data showed that brains regions near the hippocampus had a volume that could either be increased or decreased. The explanation for an increasing volume would be inflammation and activation of glial cells, while the decrease suggests cell loss leading to neurodegenerative damage (Macey et al., 2018). In addition, other studies describe a decrease in OSA patients in entropy measurement that indicates an acute change in cerebral tissue, and links it to the rupture of the BBB (Kheirandish-Gozal et al., 2018; Palomares et al., 2015).

However, the BBB is an essential structure for the protection of the CNS, limiting exchanges between the blood circulation and the brain through transporters and TJ proteins (Al Ahmad et al., 2011; Berezowski et al., 2004). TJ proteins act as a physical barrier that regulates paracellular transport; this specialized phenotype is fundamental for the protection of the brain. Moreover, efflux ABC family pumps are a protective mechanism that actively efflux compounds outside the endothelial cell and so inside the bloodstream. These proteins act like a transendothelial barrier that reduce the exposure of the CNS to xenobiotics. Since the structural and functional integrity of transporters and TJ proteins are necessary for an intact BBB, alteration of these components is a key event in the BBB's impairment. Moreover, in several pathologies it has been shown that a dysregulation of ABC transporters such as Pgp and BCRP contribute to a pharmaco-resistance phenotype as in Alzheimer's disease and epilepsy (Hermann et al., 2006; Jablonski et al., 2015).

Nowadays, patients with severe OSAS are mainly treated with a continuous positive pressure airway pressure that remains sometimes poorly tolerated by patients (Olsen et al., 2008). It is crucial to find therapies to limit neurological associated risks. However, there are no predictive tests to evaluate deleterious effect of sleep apnea on the integrity of and BBB and more precisely on endothelial cells that are a key element

to form the protective barrier. In our laboratory, we have developed a human BBB model, composed of HBEC-5i endothelial cells, in cooperation with conditioned media from human astrocytes. In this study, we have screened the effect of sera from patients on TJ proteins and ABC transporters.

We have evaluated the effect of sera on TJ proteins and ABC transporters. Sera from patients were selected with and without OSAS from the PROOF cohort, a cohort with extensive phenotype evaluation of sleep disorders. This is the first time that a screening of sera from patient effects has been realized on such endothelial cell models. This work is particularly original and shows that the HBEC-5i model may be used as predictive model of cerebrovascular consequences related to the release of cytotoxic compounds in many diseases. Our results showed a significant increase in the apparent permeability following exposure with sera (Figure 2), which showed that the BBB lost some of its physical properties and that small molecules such as Na-Fl can cross the cell barrier. This loss of permeability was evaluated by the expression of TJ proteins, since they are responsible of the physical characteristics of the BBB. Sera from patients with AHI >30 significantly decreased the expression of ZO-1 and claudin-5 proteins, while occludin expression remained unchanged (Figure 3). ZO-1 and claudin-5 being the main actors in the development and maintenance of the BBB (Katsuno et al., 2008) and a change in their expression or location led to a dysfunction of the BBB. Nevertheless, in accordance with other studies, our work showed that occludin does not play a major role in maintaining the barrier but is linked to the regulation of calcium through the BBB (Saitou et al., 2000). Prior studies have demonstrated a loss of expression of ZO-1 in human in vitro and mouse models examining the effects of amyloid beta protein on the BBB, suggesting that this process may occur in Alzheimer's disease. Therefore, our results showing modification of the expression of the TJs are similar to those prior findings which implied loss of permeability in neurodegenerative disease (Cuevas et al., 2019; Kook et al., 2013). The role of claudin-5 in such BBB dysfunction has been less recognized, but alteration of such TJ protein expression could be also interpreted as a complementary frailty of the physical properties of the barrier (Jiao et al., 2011).

In a second part, we evaluated the effect of sera on efflux pumps (ABC transporters), which efflux potentially cytotoxic compounds. These transporters are dysregulated in case of neurodegenerative disease. We showed an increase in Pgp and

a decrease in BCRP expression (Figure 4), which are data found in the literature, especially during an inflammatory stress process (Poller et al., 2010) or after intermittent hypoxia stress. The activity of efflux pumps, evaluated from the accumulation of a fluorescent substrate, showed that sleep apnea patient serum provoked an increase in ABC efflux pump activity. The results obtained after competitive inhibition is in line with a Pgp overexpression and functionality rather than BCRP protein. BCRP is underexpressed (Hartz et al., 2006; Poller et al., 2010)(Miller, 2014, 2015).

Few studies until now, have worked on the possibility to evaluate the effect of sera from patients on endothelial cells opening and the functionality of their ABC transporters. Our results are important as it demonstrated that sera from OSAS patients affect endothelial cells and many mechanisms seem to be involved to induce a BBB breakdown. One working hypothesis is the systemic inflammation in a chronic hypoxic setting. Indeed, a link has been shown between systemic inflammation and obstructive sleep apnea, with an increase in pro-inflammatory cytokines during sleep apnea (Alberti et al., 2003; Nadeem et al., 2013; Unnikrishnan et al., 2015). Nadeem et al. and others showed a higher pro-inflammatory cytokine concentration for patients with sleep apnea syndrome (Kheirandish-Gozal et al., 2019; Nadeem et al., 2013). This inflammation is known to have a deleterious effect on the integrity of the BBB, and it plays a role in ABC transporter regulation (Poller et al., 2010; de Vries et al., 1996). However, such pro-inflammatory interleukin activation is not constant in OSAS patients and more particularly in adults and in elderly. Furthermore, microparticles described in OSAS sera patients could lead by themselves to endothelial dysfunction at the brain vascular scale and could alter BBB permeability. Indeed, serum factors are not yet identified, and inflammation remains a hypothesis. Other pathways such as excessive vessel shear stress could also be involved in disruption of BBB (Jullian-Desayes et al., 2015). The discovery of the opening of the BBB after sera exposure suggests that this opening may be partly responsible for cognitive deficits; but another track of exploration is that fluid movements generated by the opening of this barrier could be involved in some cases of increased intracranial pressure. In this sense, it would be interesting to study the entry and flow processes of cerebrospinal liquid, including alteration of aquaporins.

Our study has some limitations. First of all, the “human” *in vivo* BBB function in OSAS is not well (and not easily) evaluated. Our observations on a BBB *in vitro* model could not be directly extrapolated. However, several authors using brain MRI methods proposed an alteration of the BBB function in OSAS with an increase of permeability of the barrier in hypoxic conditions (Heye et al., 2014). The impact of OSAS on brain volumes in several critical brain areas is highly probable according to VBM methodology, and astrocyte pre-activation has to also be demonstrated in a mouse model of chronic intermittent hypoxic exposure, suggesting a deleterious cellular message coming from the intravascular compartment in OSAS. Secondly, the concentration of sera in the cell culture nutritive fluid could not represent the real concentration of cytotoxic component in patients suffering OSAS. Moreover, exposure to repeated hypoxemic stress could lead to a chronic adaptation of the “physiological” endothelial cells which limit the permeability. We could underline here that we tested a short exposure to sera components. However, our results demonstrated a deleterious impact of sera of severe OSAS on endothelial function.

Conclusion

In conclusion, we demonstrated for the first time that blood compounds from severe OSAS patients induced an endothelial stress, which led to a BBB’s disorder, reflected by an opening of the paracellular pathway, with a possibility for cytotoxic compounds crossing the barrier. In response to the paracellular dysfunction, endothelial cells increased efflux transport to fight against the entry of possible cytotoxic compound in the brain and/or to accelerate the return, or the efflux of intracellular cytotoxic/neurotoxic components into the vascular flow. This study was conducted on an *in vitro* model of culture of cerebral endothelial cells in conditioned media. This model could be improved with astrocytes and pericytes; however, it has been shown earlier that it is a good pharmacological model (Puech et al., 2018a). Our work showed that our model may screen patient serum and may be an interesting tool to predict risk and evaluate therapeutic options. It is important to identify OSAS patients when assessing patients with depression or cognitive impairment. Therapeutic treatment of OSAS might change the deteriorating trajectory of elderly patients with already diagnosed vascular depression and cognitive impairment/dementia. Moreover, our model may be used to predict BBB permeability in other sleep-related disorders.

Materials and methods

Subjects

Sera from patients had been obtained from the PROOF cohort study. The PROOF recruitment consisted of 1011 volunteers aged ≥ 65 years and living in Saint-Etienne (France). The methods of evaluation and follow-up of the PROOF study have been described in laboratory studies (Sforza et al., 2010). In this cohort, sera from 29 subjects were selected: 14 subjects with severe untreated (newly diagnosed) OSAS (AHI $>$ 30) and 15 patients without OSAS (AHI $<$ 5).

The local Ethics Committee and the University Hospital (CCPRB Rhone-Alpes Loire: IRBN532016/CHUSTE) approved the PROOF Study. The CNIL (national committee for information and liberty) gave at this time agreement for data collection. And we confirm that all research was performed in accordance with guidelines and regulation.

All subjects gave their written consent to participation in the PROOF study and. Blood was collected the morning after polygraphic recording and frozen samples had been anonymous, in accordance with good practice. Sera samples were frozen at -80 C and conserved in such conditions in our sera collection. Clinical trial numbers of PROOF and SYNAPSE studies are NCT00759304 and NCT00766584.

Chemicals and reagent

Astrocyte cells (human astrocytes) were from ScienCell Research Laboratory (Carlsbad, CA, USA) and endothelial cells (HBEC-5i, human brain endothelial cells) were from ATCC (Manassas, VA, USA). Cell culture inserts for 24-well (transparent PET membrane, 0.45- μ m pore diameter size) were obtained from D. Dutscher (Alsace, France). EVOM voltohmmeter system was from World Precision Instruments (Hertfordsire, UK). Occludin antibody was from Life Technologies (Saint Aubin, France), and ZO-1 was from GeneTex (San Antonio, TX, USA). Pgp, claudin-5, BCRP and MRP-1 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). All compounds for Ringer HEPES buffer came from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) as well as BCECF-AM, probenecid, verapamil, KO143, Na-F, DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) and methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT). Rhodamine-123 was from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

In vitro BBB model use

The model was composed of HBEC-5i endothelial cells cultivated with conditioned medium from human astrocyte cells on insert as previously described (Puech et al., 2018a). All cells were cultured in DMEM-F12 HAM (supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic solution) and used before passage number 20, which corresponded to the time where these cells may begin to lose their BBB properties. HBEC-5i cells were seeded onto the luminal side of the transwell filter at a density of 4×10^5 cells/cm² and cocultured with conditioned medium for 14 d, the time to necessary to reach optimal permeability (P_{app}), and it was maintained and stable for 5 d in this model as shown in Figure 1.

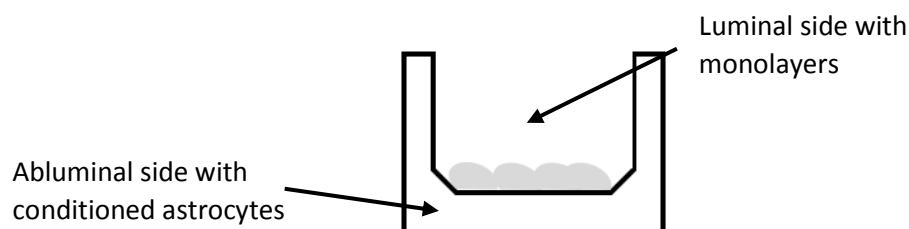


Figure 5: Schema of the human in vitro model

Na-Fl permeability measurements

The evaluation of paracellular barrier function of the endothelial cells was obtained by measuring apparent permeability of cells to Na-FL, a hydrophilic fluorescent molecule (MW: 376 Da). First, the medium was removed and cells were washed with Ringer HEPES buffer. Then Na-Fl was concentrated at 10 μ g/ml to Ringer HEPES buffer, was placed onto the apical/luminal side of the insert and were incubated at 37°C for 1 h. Samples were removed from the abluminal chamber and immediately replaced with Ringer HEPES buffer. The concentration of Na-Fl was evaluated using a fluorescence spectrophotometer (FluoroskanAscentTM, Thermo Fisher Scientific, France), with excitation (485-nm) and emission (530-nm) wavelengths. P_{app} is expressed in cm.s⁻¹ and is calculated using the following formula:

$$P_{app} = \frac{V_r}{C_0} \times \frac{1}{s} \times \frac{C_1}{t}$$

Where P_{app} is the apparent permeability, V_r is the volume of medium in the receiver chamber, C_0 and C_1 are respectively the concentration of fluorescent compound in the

donor chamber at t_0 and in the receiver chamber after t time, i.e., 1 h of incubation, and S is the area of the monolayer (Puech et al., 2018b).

Whole cell ELISA assay

Inserts with HBEC-5i monoculture were washed with 1% BSA in PBS at pH 7.4 and fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde diluted in PBS at pH 7.4. After fixation, a blockade of the endogenous peroxidase site was performed with 3% H_2O_2 in methanol for 30 min. This was followed by 20% normal goat serum to block unspecific staining. Cells were incubated with either monoclonal mouse anti-Pgp (2 $\mu\text{g/mL}$), rabbit anti-ZO-1 (4 $\mu\text{g/mL}$), rabbit anti-occludin (1 $\mu\text{g/mL}$), rabbit anti-BCRP (2 $\mu\text{g/mL}$) or rabbit anti-claudin-5 (2 $\mu\text{g/mL}$) antibodies. Then cells were washed and incubated with secondary antibody peroxidase conjugated anti-mouse or rabbit IgG for 2 h at room temperature (diluted at 1/750). After washing, TMB substrate was added for 10 min in the dark and at room temperature. After HCl neutralization, the color reaction product was measured at 490-nm with a spectrophotometer.

Drug transporter functional assays

Transendothelial transport was tested by assessing the transport of specific substrates, i.e., rhodamine-123 for Pgp and BCRP, in the presence or absence of competitive inhibitors such as verapamil for Pgp and KO143 for BCRP. Cells were cultured in DMEM-F12 and washed, then cells were preincubated in the absence or presence of inhibitors for 15 min at 37°C. Inhibitors (100 μM) were added in the abluminal compartment to study the transport from the abluminal and luminal and conversely. The abluminal compartment was incubated with BCECF-AM (1 mM) or rhodamine-123 (1 mM) for 1 h at 37°C. Finally, cells were lysed with 1% SDS, and fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer at 493-nm (excitation) and 515-nm (emission) wavelengths.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. Statistical analysis was performed using GraphPad software. The differences between means were considered to be significant when P-values were < 0.05 , and the value was

expressed as the mean \pm s.e.m. Excepted for table 1, which statistical analysis was performed using Stata 11 software and a t-test.

Author contribution statement

AC VOIRIN : design the study, and wrote the main manuscript text, she prepared and analyzed figures

F. ROCHE and N.PEREK have designed the study and have read and corrected the article.

F. ROCHE analyzed the records

S.CELLE prepared and analyzed table

Acknowledgments: This work was supported by grants from Jean Monnet University of Saint Etienne (France) and grants from DRCI of Saint Etienne University Hospital (PHRC National and PHRC Regional), France.

The authors thanks Delphine Maudoux, Maryse Victoire, Arnauld Garcin (CHU Saint Etienne), Pr JC Barthelemy, the Association Synapse, Saint-Etienne, France (Michel Segura: past President and Charles Travaglini: current President), all the participants of the Study.

Disclosure Statement: The authors declare no conflict of interest.

References

[1] K. A. Franklin, C. Sahlin, H. Stenlund, and E. Lindberg, "Sleep apnoea is a common occurrence in females," *Eur. Respir. J.*, vol. 41, no. 3, pp. 610–615, Mar. 2013.

[2] S. A. Sands et al., "Enhanced Upper-Airway Muscle Responsiveness Is a Distinct Feature of Overweight/Obese Individuals without Sleep Apnea," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 190, no. 8, pp. 930–937, Sep. 2014.

[3] A. E. Beaudin, X. Waltz, P. J. Hanly, and M. J. Poulin, "Impact of obstructive sleep apnoea and intermittent hypoxia on cardiovascular and cerebrovascular regulation," *Exp. Physiol.*, vol. 102, no. 7, pp. 743–763, 2017.

- [4] E. Sforza and F. Roche, "Chronic intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: an experimental and clinical approach," *Hypoxia Auckl. Nz*, vol. 4, pp. 99–108, 2016.
- [5] A. R. Nelson, M. D. Sweeney, A. P. Sagare, and B. V. Zlokovic, "Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta Bba - Mol. Basis Dis.*, vol. 1862, no. 5, pp. 887–900, May 2016.
- [6] A.-A. Baril et al., "Biomarkers of dementia in obstructive sleep apnea," *Sleep Med. Rev.*, vol. 42, pp. 139–148, 2018.
- [7] W. Pan and A. J. Kastin, "Can sleep apnea cause Alzheimer's disease?," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 47, pp. 656–669, Nov. 2014.
- [8] H. M. Engleman and M. R. Wild, "Improving CPAP use by patients with the sleep apnoea/hypopnoea syndrome (SAHS)," *Sleep Med. Rev.*, vol. 7, no. 1, pp. 81–99, Feb. 2003.
- [9] S. Olsen, S. Smith, and T. P. S. Oei, "Adherence to Continuous Positive Airway Pressure Therapy in Obstructive Sleep Apnoea sufferers: A theoretical approach to treatment adherence and intervention," *Clin. Psychol. Rev.*, vol. 28, no. 8, pp. 1355–1371, Dec. 2008.
- [10] D. C. Lim and A. I. Pack, "Obstructive sleep apnea and cognitive impairment: Addressing the blood–brain barrier," *Sleep Med. Rev.*, vol. 18, no. 1, pp. 35–48, Feb. 2014.
- [11] B. T. Hawkins and T. P. Davis, "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease," *Pharmacol. Rev.*, vol. 57, no. 2, pp. 173–185, Jun. 2005.
- [12] V. Muoio, P. B. Persson, and M. M. Sendeski, "The neurovascular unit - concept review," *Acta Physiol. Oxf. Engl.*, vol. 210, no. 4, pp. 790–798, Apr. 2014.
- [13] N. J. Abbott, "Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 36, no. 3, pp. 437–449, May 2013.
- [14] T. Wanek, S. Mairinger, and O. Langer, "Radioligands targeting P-glycoprotein and other drug efflux proteins at the blood-brain barrier," *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 56, no. 3–4, pp. 68–77, Apr. 2013.
- [15] C. Puech et al., "Assessment of HBEC-5i endothelial cell line cultivated in astrocyte conditioned medium as a human blood-brain barrier model for ABC drug transport studies," *Int. J. Pharm.*, vol. 551, no. 1, pp. 281–289, Nov. 2018.
- [16] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson, "Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 1, pp. 41–53, Jan. 2006.

- [17] R. C. Janzer and M. C. Raff, "Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells," *Nature*, vol. 325, no. 6101, pp. 253–257, Jan. 1987.
- [18] D. E. Eigenmann, G. Xue, K. S. Kim, A. V. Moses, M. Hamburger, and M. Oufir, "Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood–brain barrier model for drug permeability studies," *Fluids Barriers Cns*, vol. 10, no. 1, p. 33, Nov. 2013.
- [19] K. Hayashi, S. Nakao, R. Nakaoka, S. Nakagawa, N. Kitagawa, and M. Niwa, "Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood–brain barrier," *Regul. Pept.*, vol. 123, no. 1, pp. 77–83, Dec. 2004.
- [20] P. Ballabh, A. Braun, and M. Nedergaard, "The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications," *Neurobiol. Dis.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2004.
- [21] M. D. Sweeney, A. P. Sagare, and B. V. Zlokovic, "Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 14, no. 3, pp. 133–150, Mar. 2018.
- [22] H.-L. Tan, L. Kheirandish-Gozal, and D. Gozal, "Sleep, Sleep Disorders, and Immune Function," in *Allergy and Sleep: Basic Principles and Clinical Practice*, A. Fishbein and S. H. Sheldon, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 3–15.
- [23] P. M. Macey et al., "Sex-specific hippocampus volume changes in obstructive sleep apnea," *Neuroimage Clin.*, vol. 20, pp. 305–317, 2018.
- [24] J. A. Palomares et al., "Water Exchange across the Blood-Brain Barrier in Obstructive Sleep Apnea: An MRI Diffusion-Weighted Pseudo-Continuous Arterial Spin Labeling Study: Altered BBB Function in OSA.," *J. Neuroimaging*, vol. 25, no. 6, pp. 900–905, Nov. 2015.
- [25] L. Kheirandish-Gozal, A. K. Sahib, P. M. Macey, M. F. Philby, D. Gozal, and R. Kumar, "Regional brain tissue integrity in pediatric obstructive sleep apnea," *Neurosci. Lett.*, vol. 682, pp. 118–123, Aug. 2018.
- [26] A. Al Ahmad, C. B. Taboada, M. Gassmann, and O. O. Ogunshola, "Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult," *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 31, no. 2, pp. 693–705, Feb. 2011.
- [27] V. Berezowski, C. Landry, M.-P. Dehouck, R. Cecchelli, and L. Fenart, "Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier," *Brain Res.*, vol. 1018, no. 1, pp. 1–9, Aug. 2004.

- [28] D. M. Hermann, E. Kilic, A. Spudich, S. D. Krämer, H. Wunderli-Allenspach, and C. L. Bassetti, “Role of drug efflux carriers in the healthy and diseased brain,” *Ann. Neurol.*, vol. 60, no. 5, pp. 489–498, 2006.
- [29] M. Jablonski, D. S. Miller, P. Pasinelli, and D. Trotti, “ABC transporter-driven pharmacoresistance in Amyotrophic Lateral Sclerosis,” *Brain Res.*, vol. 1607, pp. 1–14, May 2015.
- [30] T. Katsuno et al., “Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 6, pp. 2465–2475, Jun. 2008.
- [31] M. Saitou et al., “Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, no. 12, pp. 4131–4142, Dec. 2000.
- [32] E. Cuevas et al., “Amyloid Beta 25–35 induces blood-brain barrier disruption in vitro,” *Metab. Brain Dis.*, Jul. 2019.
- [33] S.-Y. Kook, H. S. Hong, M. Moon, and I. Mook-Jung, “Disruption of blood-brain barrier in Alzheimer disease pathogenesis,” *Tissue Barriers*, vol. 1, no. 2, p. e23993, Apr. 2013.
- [34] H. Jiao, Z. Wang, Y. Liu, P. Wang, and Y. Xue, “Specific Role of Tight Junction Proteins Claudin-5, Occludin, and ZO-1 of the Blood–Brain Barrier in a Focal Cerebral Ischemic Insult,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 44, no. 2, pp. 130–139, Jun. 2011.
- [35] B. Poller, J. Drewe, S. Krähenbühl, J. Huwyler, and H. Gutmann, “Regulation of BCRP (ABCG2) and P-Glycoprotein (ABCB1) by Cytokines in a Model of the Human Blood–Brain Barrier,” *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 30, no. 1, pp. 63–70, Jan. 2010.
- [36] A. M. S. Hartz, B. Bauer, G. Fricker, and D. S. Miller, “Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 69, no. 2, pp. 462–470, Feb. 2006.
- [37] D. S. Miller, “ABC transporter regulation by signaling at the blood-brain barrier: relevance to pharmacology,” *Adv. Pharmacol. San Diego Calif*, vol. 71, pp. 1–24, 2014.
- [38] D. S. Miller, “Regulation of ABC transporters blood-brain barrier: the good, the bad, and the ugly,” *Adv. Cancer Res.*, vol. 125, pp. 43–70, 2015.
- [39] A. Alberti et al., “Plasma cytokine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a preliminary study,” *J. Sleep Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 305–311, 2003.
- [40] R. Nadeem et al., “Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis,” *J. Clin. Sleep Med. Jcsm Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.*, vol. 9, no. 10, pp. 1003–1012, Oct. 2013.

- [41] D. Unnikrishnan, J. Jun, and V. Polotsky, "Inflammation in sleep apnea: An update," *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 16, no. 1, pp. 25–34, Mar. 2015.
- [42] L. Kheirandish-Gozal, H.-L. Tan, and D. Gozal, "Sleep-Related Breathing Disorders and Inflammation: TNF- α and IL-6 as Prototypic Examples," in *Allergy and Sleep: Basic Principles and Clinical Practice*, A. Fishbein and S. H. Sheldon, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 227–245.
- [43] H. E. de Vries et al., "The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro," *J. Neuroimmunol.*, vol. 64, no. 1, pp. 37–43, Jan. 1996.
- [44] I. Jullian-Desayes et al., "Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: a systematic review from sham CPAP randomized controlled trials.," *Sleep Med Rev*, vol. 21, pp. 23–38, 2015.
- [45] A. K. Heye, R. D. Culling, M. del C. Valdés Hernández, M. J. Thrippleton, and J. M. Wardlaw, "Assessment of blood–brain barrier disruption using dynamic contrast-enhanced MRI. A systematic review," *Neuroimage Clin.*, vol. 6, pp. 262–274, Jan. 2014.
- [46] E. Sforza et al., "Cognitive Function and Sleep Related Breathing Disorders in a Healthy Elderly Population: the Synapse Study," *Sleep*, vol. 33, no. 4, pp. 515–521, Apr. 2010.
- [47] C. Puech, X. Delavenne, and N. Perek, "The expected characteristics of an in vitro human Blood Brain Barrier model derived from cell lines, for studying how ABC transporters influence drug permeability," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 45, pp. 159–167, Jun. 2018.

Conclusion des travaux personnels

À travers nos études, nous avons voulu améliorer les connaissances sur les conséquences du SAOS au niveau d'une des structures principales de protection du cerveau : barrière hématoencéphalique. Nous avons montré une altération de l'endothélium de cette BHE dans un modèle *in vitro*, avec une ouverture de la voie paracellulaire mais également la mise en place de mécanismes de défense par les cellules endothéliales, le composant principal. Ces modifications ont été observées au cours de nos travaux portant sur une approche globale des biomarqueurs circulants lors d'un SAOS, mais aussi lors des mécanismes sous-jacents impliqués tels que l'inflammation de bas grade et l'hypoxie intermittente chronique.

Enfin, nous montrons le potentiel adaptatif de l'endothélium suite à une hypoxie intermittente, permettant de contrecarrer partiellement au moins les effets délétères de l'hypoxie intermittent dans un premier temps. Nous démontrons également le potentiel thérapeutique de l'inhibiteur YC-1 de la voie HIF-1 α , dans le cadre de l'hypoxie intermittente et ceci avec les deux méthodes d'induction chimique et physique de cette voie. YC-1 a déjà montré son potentiel dans la prévention de l'augmentation de la perméabilité de la BHE en *in vitro* et *in vivo* dans d'autres études portant sur l'hypoxie aigue et doit être envisagé dans les travaux futurs (Yang et al., 2015; Yeh et al., 2007).

Troisième partie :

Discussion générale

et perspectives

Discussion générale

Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil est un véritable enjeu sociétal, cette pathologie étant associée à des déficits cognitifs qui influencent la qualité de vie des sujets en particulier des sujets âgés. A ce jour, le traitement le plus efficace pour les formes sévères reste la pression positive continue nocturne présentant une certaine lourdeur d'utilisation avec un impact à moyen terme sur l'observance. C'est pourquoi, il est important de comprendre les mécanismes sous-jacents à ce syndrome, afin de mieux prendre en charge, peut-être par des thérapeutiques médicamenteuses, les conséquences neurologiques de ce désordre.

Le SAOS est caractérisé par des arrêts répétés du flux respiratoire et des micros-éveils associés. Ces désordres sont favorisés par des facteurs comme l'obésité et l'âge. Les comorbidités cardiovasculaires et cérébrovasculaires sont importantes. L'une des hypothèses évoquées pour expliquer les conséquences cérébrales associées, est l'altération de l'une des structures protectrices de notre cerveau : la barrière hématoencéphalique.

La barrière hématoencéphalique est une barrière cellulaire composée principalement d'un endothélium cérébral, qui permet de séparer le compartiment cérébral de la circulation sanguine. Cet endothélium forme avec les neurones, les astrocytes ou encore les péricytes, l'unité neurovasculaire, chacun des éléments influençant à sa manière l'intégrité de la barrière. Le rôle majeur de cette structure est de limiter l'entrée et/ou favoriser la sortie de composés potentiellement cytotoxiques. On admet aisément qu'une altération de son intégrité puisse engendrer des déficits neurologiques par le passage de ces composés étrangers. Afin d'évaluer son intégrité, il existe *in vitro* des modèles de BHE, qui sont caractérisés par une étanchéité paracellulaire (mesurée par la perméabilité et l'expression des jonctions serrées) et par un transport transcellulaire fonctionnel (mesuré via l'expression des protéines ABC-transport)

Au cours de nos travaux, nous nous sommes intéressés aux modifications subies par les cellules endothéliales micro-vasculaires cérébrales dans un modèle *in vitro* de BHE, suite à différents stress retrouvés dans le SAOS.

Nous avons tout d'abord réalisé une étude qui porte sur l'hypoxie intermittente chronique, la conséquence directe et majeure du syndrome d'apnée obstructive du sommeil. A travers cette étude, nous avons voulu mettre en évidence l'effet de l'hypoxie intermittente chronique sur l'altération de la barrière hématoencéphalique. De plus, dans le but d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un SAOS, nous nous sommes intéressés à la capacité préventive d'un inhibiteur de la voie principale de l'hypoxie HIF-1. Nos résultats ont montré qu'un stress hypoxique intermittent « chimique » induisait une altération progressive de la BHE au cours des cycles hypoxiques successifs. L'utilisation combinée d'un inhibiteur de la voie HIF-1 entraîne une réversion complète de cette altération. Ces résultats confirment que l'hydralazine est un bon activateur de la voie HIF-1 et que dans le cadre de l'inhibition de la voie HIF-1, l'inhibiteur YC-1 joue pleinement son rôle. Cependant lorsque nous avons soumis notre modèle de barrière hématoencéphalique à une hypoxie intermittente dite « physique », nous montrons alors une adaptation des cellules endothéliales au cours des cycles, ce qui corrèlerait avec d'autres études, impliquant un conditionnement cellulaire à l'hypoxie (Navarrete-Opazo and Mitchell, 2014). De plus l'inhibition de la voie HIF-1 par YC-1 au cours de ces cycles, ne nous montre pas de réversion complète des altérations observées dans le modèle de BHE, laissant penser à l'implication d'autres voies cellulaires telles que le stress oxydant. Mais c'est également ce qui nous a amené à penser que la réponse inflammatoire pouvait avoir un rôle important dans l'altération de la BHE (Eltzschig and Carmeliet, 2011).

A partir de cette étude concernant l'hypoxie et son inhibition, et sachant que l'hypoxie intermittente et la fragmentation du sommeil, qui sont les mécanismes directement consécutifs du SAOS, déclenchent tous deux, (et pris séparément) une réponse inflammatoire, nous nous sommes intéressés au rôle spécifique hors contexte hypoxique de cette inflammation chronique de bas grade. De plus comme physiologiquement les cytokines proinflammatoires circulantes n'agissent pas seules, nous avons comparé l'effet des cytokines proinflammatoires seules à celui plus habituel des cytokines combinées. Nos résultats montrent une ouverture de la voie paracellulaire associée à un stress inflammatoire, ainsi que la mise en place d'un système de défense se traduisant par une augmentation de l'expression des pompes d'efflux. Cette influence au niveau de l'endothélium cérébrale est d'autant plus importante que les cytokines interagissent entre elles. Ce dernier élément implique une

action synergique et/ou additive des cytokines entre elles, action démontrée dans la littérature dans les travaux portant sur l'influence de l'IL-17 dans la production de l'IL-6 par exemple (Mills, 2008). De plus il existe bien un lien entre les cytokines IL-17 et TNF- α , avec une influence positive de l'IL-17 sur le TNF- α (Nichols et al., 2009), et réciproquement (Amatya et al., 2017; Granet and Miossec, 2004; Hot et al., 2012). Qui plus est, ces influences entre les cytokines pourraient être médiées par la voie NF- κ B, qui est l'une des voies majeures de la réponse inflammatoire et qui peut également être associée à l'hypoxie (Eltzschig and Carmeliet, 2011; Htoo et al., 2006; Williams and Scharf, 2007).

Pour finir, nous nous sommes intéressés à l'influence globale du SAOS, via l'utilisation de sérum de patients ayant ou non un SAOS. Ces résultats nous montrent que les biomarqueurs sériques altèrent les caractéristiques de la BHE, entraînant une ouverture de la voie paracellulaire, mais que les cellules endothéliales réagissent favorablement en régulant leur système de pompe d'efflux (ABC-transporteur). Dans cette étude, nous apportons une preuve de plus pour l'hypothèse de l'altération de la BHE dans le SAOS en particulier s'il est sévère. Cependant la diversité des molécules retrouvés au niveau sérique est importante, et des méta-analyses évoquent dans certains cas une surexpression de molécules inflammatoires (Nadeem et al., 2013; Roche et al., 2009) ce qui pourrait expliquer la régulation particulière des ABC-transporteurs, avec une augmentation de P-gp et une diminution de BCRP (Poller et al., 2010). P-gp compensant probablement la perte d'expression de BCRP. D'autres biomarqueurs associés à l'hypoxie, tels que le VEGF, connu pour être stimulés en hypoxie (Yang et al., 2018), ou encore des marqueurs de stress oxydant (Jullian-Desayes et al., 2015) pourraient également contribuer à l'altération de la barrière hémato-encéphalique.

Nous mettons en évidence dans nos travaux, que l'altération de la barrière hématoencéphalique est une hypothèse plus que plausible, potentiellement responsable des déficits neuronaux observés chez des patients SAOS sévères, en formant un lien complexe entre le syndrome d'apnée obstructive du sommeil, l'hypoxie intermittente chronique et l'inflammation de bas grade qui en résulte. Chacun de ces facteurs semble jouer un rôle dans l'altération de l'intégrité de

l'endothélium de nos modèles *in vitro* de BHE comme représenté schématiquement ci-dessous.

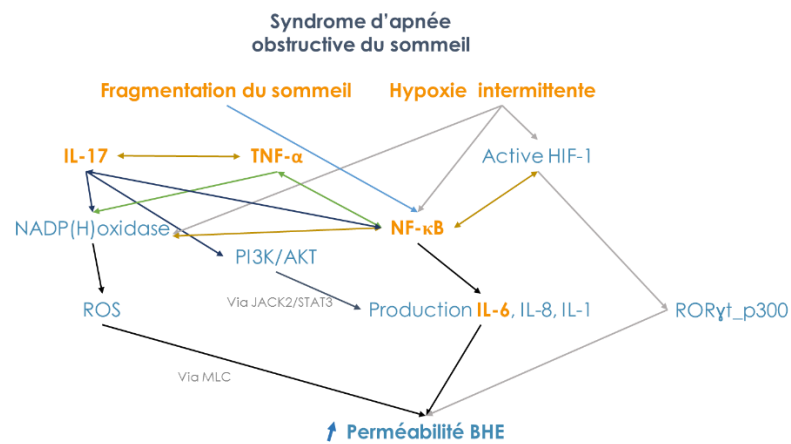


Figure 37 : Représentation schématique des interactions complexes des mécanismes associés à un syndrome d'apnée du sommeil obstructif.

Perspectives

L'ensemble de ces travaux apportent de nouvelles connaissances dans le domaine du syndrome d'apnée obstructive du sommeil. Cependant ces travaux apportent également de nouvelles perspectives :

- ✚ Tout d'abord en ce qui concerne les biomarqueurs sériques, il serait intéressant de faire un dosage des biomarqueurs de l'inflammation IL-6, l'IL-17 et le TNF- α . Mais également d'élargir ce dosage à d'autres biomarqueurs tels que les CRP, important dans le processus inflammatoire et ceux associés à l'hypoxie et à la voie HIF-1 tels que le VEGF, ou des marqueurs de stress oxydant en particulier.
- ✚ Ensuite, nous avons montré la prévention associée à l'utilisation d'un inhibiteur YC1 de la voie HIF-1. Il serait intéressant d'évaluer, si une prévention est également possible dans le cadre du stress inflammatoire, avec l'utilisation d'inhibiteur clinique comme par exemple l'Etanercept pour TNF- α , le Tocilizumab pour l'IL-6 et l'Ixekizumab/taltz® pour l'IL-17, en vérifiant au préalable qu'ils ne

soient pas pris en charge par les ABC-transporteurs, qui sont en partie responsable de la résistance aux médicaments.

✚ De plus comme nos résultats en hypoxie « physique » montre une réversion incomplète, et que l'une des hypothèses explicatives est l'activation de la voie NFκB, il serait intéressant d'évaluer l'activité de cette voie après une hypoxie intermittente chronique « physique ». Egalement, dans le sens de la perspective précédente il faudrait évaluer le potentiel préventif d'inhibiteur de la voie inflammatoire, soit en inhibant les cytokines, soit en inhibant la voie NFκB, (avec ou sans inhibition de la voie HIF). Tout ceci nous permettrait de comprendre si l'association d'inhibiteur de ces deux voies amène à une réversion plus complète de l'altération de la BHE. Cela permettrait à plus long terme d'envisager des thérapeutiques pour les patients souffrant d'un SAOS, dont ces deux mécanismes sont les principales conséquences physiopathologiques.

✚ Cependant il ne faut pas oublier que l'hypoxie, joue un rôle dans l'activation d'autres voies, tels que le stress oxydant, et que des études de serum issus de patients atteints de SAOS ont montré l'augmentation de facteurs de stress oxydant (Jullian-Desayes et al., 2015). De plus, ce stress oxydant est connu pour exacerber la réponse inflammatoire créant un cercle vicieux entre les processus inflammatoires et hypoxiques non négligeable (Lavie, 2015).

Nous n'envisageons ici que le stress hypoxique intermittent lié au SAOS. Or ce syndrome implique également une fragmentation du sommeil. Même si l'on comprend facilement que la fragmentation du sommeil en culture cellulaire n'est pas possible, l'une des perspectives des travaux du laboratoire, qui justifie l'utilisation d'un modèle murin de BHE, est la mise en place de travaux sur la fragmentation du sommeil en *in vivo* avec l'acquisition de cages de fragmentation du sommeil, et qui font l'objet d'une thèse qui a débuté en octobre 2019.

Ces premières perspectives portent sur les voies impliquées dans un syndrome d'apnée obstructive du sommeil, cependant d'autres perspectives portent sur les modèles de barrière hématoencéphalique.

✚ Dans ce cas, l'une des premières perspectives associées directement à ce travail concerne l'influence astrocytaire. En effet, tout ce travail de thèse a consisté à évaluer l'effet de nos « stress » hypoxiques et inflammatoires sur l'endothélium cérébral dans des modèles de coculture influencés par le contact direct ou indirect avec les astrocytes. En revanche, nous n'avons pas évalué le rôle des astrocytes subissant le stress sur les cellules endothéliales. Or des études montrent une modification du comportement astrocytaire que ce soit avec la neuro-inflammation (Asgari et al., 2015), ou encore en hypoxie (Neuhaus et al., 2014). Il serait donc maintenant intéressant d'envisager une étude plus approfondie des astrocytes, que ce soit sur les facteurs libérés lors d'une hypoxie et d'un stress inflammatoire, mais également sur leurs éventuels changements de conformation pouvant influencer le modèle de BHE et ses qualités intrinsèques.

✚ Certains auteurs verront dans nos modèles, une possibilité de les complexifier, notamment avec des systèmes de shear stress, pour pouvoir évaluer l'impact des forces de cisaillement, ou encore avec un modèle de triculture, impliquant les péricytes qui jouent eux aussi un rôle dans la mise en place et le maintien de la barrière hématoencéphalique. Ces configurations nous permettraient de nous rapprocher encore plus de la physiologie humaine, mais nous poserait également d'autres questions concernant l'implication de chacun des types cellulaires dans les réponses complexes associés au syndrome d'apnée du sommeil.

En conclusion, au cours de ces travaux nous avons étudié l'effet du syndrome d'apnée obstructive du sommeil sur la barrière hématoencéphalique. Nous avons étudié l'effet d'un syndrome complexe et multifactoriel sur une structure cérébrale complexe et multicellulaire. Dans le but de mieux comprendre

et d'améliorer la qualité de vie et de freiner les conséquences neurocognitives des patients souffrant d'un SAOS, nous devons nous intéresser à chaque mécanisme, à chaque type cellulaire, et ceci de manière individuel puis les envisager dans un ensemble plus complexe, en améliorant et complexifiant les modèles cellulaires avant de passer à des modèles d'expérimentations animales puis cliniques. C'est un travail long et fastidieux, qui se déroule étape après étape, et qui permet d'améliorer les connaissances sur le SAOS et ses effets sur la perméabilité de la BHE et qui peut être un jour amènera à de nouvelles thérapeutiques pour les patients souffrants d'un syndrome d'apnée du sommeil obstructif.

Perspectives personnelles

A la fin de cette thèse, je souhaite faire un « post-doctorat » à l'étranger, si possible dans le domaine de la barrière hématoencéphalique et de son altération dans les pathologies associées aux déficits neurocognitifs. Cependant l'étude du cerveau dans sa globalité est un domaine que j'affectionne particulièrement, et je considère le « post doctorat » comme une ouverture, et un moyen de parfaire mes connaissances dans le domaine de la biologie « cérébrale », ainsi qu'un bon moyen d'apprendre de nouvelles techniques. Cette mobilité me permettra à long terme de candidater sur des postes d'enseignante-chercheuse, des concours de postes de maître de conférences. Ce profil de poste retient tout mon intérêt et me permettra de combiner la recherche avec l'enseignement, qui est l'une des manières de transmettre les connaissances les plus enrichissantes.

Bibliographie

Abbott, N.J. (2000). Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell. Mol. Neurobiol.* *20*, 131–147.

Abbott, N.J., and Friedman, A. (2012). Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia* *53 Suppl 6*, 1–6.

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 41–53.

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* *37*, 13–25.

Abbruscato, T.J., and Davis, T.P. (1999). Combination of hypoxia/aglycemia compromises in vitro blood-brain barrier integrity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *289*, 668–675.

Abeywardena, M.Y., Leifert, W.R., Warnes, K.E., Varghese, J.N., and Head, R.J. (2009). Cardiovascular biology of interleukin-6. *Curr. Pharm. Des.* *15*, 1809–1821.

Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* *8*, 942–949.

Adhikary, G., Kline, D., Yuan, G., Kumar, G.K., Simonson, M.S., Cherniack, N.S., and Prabhakar, N.R. (2001). Gene regulation during intermittent hypoxia: evidence for the involvement of reactive oxygen species. *Adv. Exp. Med. Biol.* *499*, 297–302.

Agarwal, S., Sane, R., Ohlfest, J.R., and Elmquist, W.F. (2011). The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *336*, 223–233.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 745–756.

Aguzzi, A., Barres, B.A., and Bennett, M.L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* *339*, 156–161.

Al Ahmad, A., Taboada, C.B., Gassmann, M., and Ogunshola, O.O. (2011). Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *31*, 693–705.

Akassoglou, K., Douni, E., Bauer, J., Lassmann, H., Kollias, G., and Probert, L. (2003). Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 709–714.

- Akira, S., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* *54*, 1–78.
- Allen, J.D., Brinkhuis, R.F., Wijnholds, J., and Schinkel, A.H. (1999). The mouse *Bcrp1/Mxr/Abcp* gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* *59*, 4237–4241.
- Aloia, M.S., Arnedt, J.T., Davis, J.D., Riggs, R.L., and Byrd, D. (2004). Neuropsychological sequelae of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: a critical review. *J. Int. Neuropsychol. Soc. Jins* *10*, 772–785.
- Alvarez, J.I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P.J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonnière, L., Bernard, M., et al. (2011). The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* *334*, 1727–1731.
- Amatya, N., Garg, A.V., and Gaffen, S.L. (2017). IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* *38*, 310–322.
- Anderson, M.E., Buchwald, Z.S., Ko, J., Aurora, R., and Sanford, T. (2014). Patients with pediatric obstructive sleep apnea show altered T-cell populations with a dominant TH17 profile. *Otolaryngol.--Head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol.-Head Neck Surg.* *150*, 880–886.
- Argaw, A.T., Gurfein, B.T., Zhang, Y., Zameer, A., and John, G.R. (2009). VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1977–1982.
- Argaw, A.T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J.N., Mahase, S., Dutta, D.J., Seto, J., Kramer, E.G., et al. (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* *122*, 2454–2468.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., et al. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* *468*, 557–561.
- Arthur, F.E., Shivers, R.R., and Bowman, P.D. (1987). Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Brain Res.* *433*, 155–159.
- Asgari, N., Berg, C.T., Mørch, M.T., Khoroshi, R., and Owens, T. (2015). Cerebrospinal fluid aquaporin-4-immunoglobulin G disrupts blood brain barrier. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* *2*, 857–863.
- Assoumou, H.-G.N., Gaspoz, J.-M., Sforza, E., Pichot, V., Celle, S., Maudoux, D., Kossovsky, M., Chouchou, F., Barthelemy, J.-C., and Roche, F. (2012). Obstructive sleep apnea and the metabolic syndrome in an elderly healthy population: the SYNAPSE cohort. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* *16*, 895–902.
- Badaut, J., Lasbennes, F., Magistretti, P.J., and Regli, L. (2002). Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *22*, 367–378.

- Badaut, J., Fukuda, A.M., Jullienne, A., and Petry, K.G. (2014). Aquaporin and brain diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1554–1565.
- Bakos, É., Evers, R., Szakács, G., Tusnády, G.E., Welker, E., Szabó, K., Haas, M. de, Deemter, L. van, Borst, P., Váradi, A., et al. (1998). Functional Multidrug Resistance Protein (MRP1) Lacking the N-terminal Transmembrane Domain. *J. Biol. Chem.* 273, 32167–32175.
- Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16, 1–13.
- Bandopadhyay, R., Orte, C., Lawrenson, J.G., Reid, A.R., De Silva, S., and Allt, G. (2001). Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J. Neurocytol.* 30, 35–44.
- Banks, W.A. (2005). Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Curr. Pharm. Des.* 11, 973–984.
- Baril, A.-A., Carrier, J., Lafrenière, A., Warby, S., Poirier, J., Osorio, R.S., Ayas, N., Dubé, M.-P., Petit, D., Gosselin, N., et al. (2018). Biomarkers of dementia in obstructive sleep apnea. *Sleep Med. Rev.* 42, 139–148.
- Barthélémy, J.-C., Pichot, V., Dauphinot, V., Celle, S., Laurent, B., Garcin, A., Maudoux, D., Kerleroux, J., Lacour, J.-R., Kossovsky, M., et al. (2007). Autonomic nervous system activity and decline as prognostic indicators of cardiovascular and cerebrovascular events: the “PROOF” Study. Study design and population sample. Associations with sleep-related breathing disorders: the “SYNAPSE” Study. *Neuroepidemiology* 29, 18–28.
- Basuroy, S., Bhattacharya, S., Leffler, C.W., and Parfenova, H. (2009). Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C422–432.
- Bauer, H., and Traweger, A. (2016). Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier - A Molecular Gatekeeper. *Cns Neurol. Disord. Drug Targets* 15, 1016–1029.
- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., and Bauer, H.C. (2010). The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 402593.
- Bazzoni, G. (2006). Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb. Haemost.* 95, 36–42.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* 84, 869–901.
- Beaudin, A.E., Waltz, X., Hanly, P.J., and Poulin, M.J. (2017). Impact of obstructive sleep apnoea and intermittent hypoxia on cardiovascular and cerebrovascular regulation. *Exp. Physiol.* 102, 743–763.
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Sagare, A.P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., and Zlokovic, B.V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68, 409–427.

- Benedetti, G., and Miossec, P. (2014). Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 44, 339–347.
- Berezowski, V., Landry, C., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2004). Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 1018, 1–9.
- Berezowski, V., Fukuda, A.M., Cecchelli, R., and Badaut, J. (2012). Endothelial cells and astrocytes: a concerto en duo in ischemic pathophysiology. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 176287.
- Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nierwińska, K., and Małecki, A. (2008). Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol. Reports Pr* 60, 600–622.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., and Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *Embo J.* 22, 4082–4090.
- Berry, R.B., Budhiraja, R., Gottlieb, D.J., Gozal, D., Iber, C., Kapur, V.K., Marcus, C.L., Mehra, R., Parthasarathy, S., Quan, S.F., et al. (2012). Rules for scoring respiratory events in sleep: update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine. *J. Clin. Sleep Med. Jcsm Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* 8, 597–619.
- Bickel, U. (2005). How to Measure Drug Transport across the Blood-Brain Barrier. *NeuroRx* 2, 15–26.
- Bixler, E.O., Vgontzas, A.N., Ten Have, T., Tyson, K., and Kales, A. (1998). Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 144–148.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385, 729–733.
- Bolton, S.J., Anthony, D.C., and Perry, V.H. (1998). Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 86, 1245–1257.
- Bonkowski, D., Katyshev, V., Balabanov, R.D., Borisov, A., and Dore-Duffy, P. (2011). The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers Cns* 8, 8.
- Bonomini, F., Francesca, B., and Rezzani, R. (2010). Aquaporin and blood brain barrier. *Curr. Neuropharmacol.* 8, 92–96.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1295–1302.
- Boulanger, M.J., Chow, D., Brevnova, E.E., and Garcia, K.C. (2003). Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 α -receptor/gp130 complex. *Science* 300, 2101–2104.
- Brasier, A.R. (2010). The nuclear factor- κ B–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* 86, 211–218.

- Bresgen, N., Karlhuber, G., Krizbai, I., Bauer, H., Bauer, H.C., and Eckl, P.M. (2003). Oxidative stress in cultured cerebral endothelial cells induces chromosomal aberrations, micronuclei, and apoptosis. *J. Neurosci. Res.* *72*, 327–333.
- Breuninger, L.M., Paul, S., Gaughan, K., Miki, T., Chan, A., Aaronson, S.A., and Kruh, G.D. (1995). Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res.* *55*, 5342–5347.
- Broadbent, W.H. (1877). ON CHEYNE-STOKES' RESPIRATION IN CEREBRAL HÆMORRHAGE. *The Lancet* *109*, 307–309.
- Brown, R.C., Morris, A.P., and O'Neil, R.G. (2007). Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* *1130*, 17–30.
- Bucks, R.S., Olaithe, M., and Eastwood, P. (2013). Neurocognitive function in obstructive sleep apnoea: a meta-review. *Respirol. Carlton Vic* *18*, 61–70.
- Bucks, R.S., Olaithe, M., Rosenzweig, I., and Morrell, M.J. (2017). Reviewing the relationship between OSA and cognition: Where do we go from here? *Respirol. Carlton Vic* *22*, 1253–1261.
- Campbell, I.L., Abraham, C.R., Masliah, E., Kemper, P., Inglis, J.D., Oldstone, M.B., and Mucke, L. (1993). Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10061–10065.
- Candela, P., Gosselet, F., Saint-Pol, J., Sevin, E., Boucau, M.-C., Boulanger, E., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2010). Apical-to-basolateral transport of amyloid- β peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J. Alzheimers Dis. JAD* *22*, 849–859.
- Cardoso, F.L., Kittel, A., Veszelka, S., Palmela, I., Tóth, A., Brites, D., Deli, M.A., and Brito, M.A. (2012). Exposure to lipopolysaccharide and/or unconjugated bilirubin impair the integrity and function of brain microvascular endothelial cells. *Plos One* *7*, e35919.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 3666–3670.
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.-P., and Fenart, L. (2007). Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 650–661.
- Cervellati, F., Cervellati, C., Romani, A., Cremonini, E., Sticozzi, C., Belmonte, G., Pessina, F., and Valacchi, G. (2014). Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells. *Free Radic. Res.* *48*, 303–312.
- Chabaud, M., Durand, J.M., Buchs, N., Fossiez, F., Page, G., Frappart, L., and Miossec, P. (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum.* *42*, 963–970.

- Chatard, M. (2017). Etude des conséquences de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité d'un modèle in vitro de barrière hémato-encéphalique.
- Chatard, M., Puech, C., Roche, F., and Perek, N. (2016). Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an Increase in Efflux Transporter Activity. *Plos One* *11*, e0158010.
- Chatard, M., Puech, C., Perek, N., and Roche, F. (2017). Hydralazine is a Suitable Mimetic Agent of Hypoxia to Study the Impact of Hypoxic Stress on In Vitro Blood-Brain Barrier Model. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *42*, 1592–1602.
- Chen, C., Ostrowski, R.P., Zhou, C., Tang, J., and Zhang, J.H. (2010). Suppression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its downstream genes reduces acute hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation in a rat model of cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* *88*, 2046–2055.
- Choi, Y.K., and Kim, K.-W. (2008). Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *Bmb Reports* *41*, 345–352.
- Chu, H., Huang, C., Ding, H., Dong, J., Gao, Z., Yang, X., Tang, Y., and Dong, Q. (2016). Aquaporin-4 and Cerebrovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Cioni, C., Turlizzi, E., Zanelli, U., Oliveri, G., and Annunziata, P. (2012). Expression of Tight Junction and Drug Efflux Transporter Proteins in an in vitro Model of Human Blood–Brain Barrier. *Front. Psychiatry* *3*.
- Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F., and Scherrmann, J.-M. (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res.* *64*, 3296–3301.
- Cohen, Z., Molinatti, G., and Hamel, E. (1997). Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *17*, 894–904.
- Cole, S.P., Sparks, K.E., Fraser, K., Loe, D.W., Grant, C.E., Wilson, G.M., and Deeley, R.G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* *54*, 5902–5910.
- Cooray, H.C., Blackmore, C.G., Maskell, L., and Barrand, M.A. (2002). Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* *13*, 2059–2063.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., and Bertino, J.R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 695–698.
- Daneman, R. (2012). The blood-brain barrier in health and disease. *Ann. Neurol.* *72*, 648–672.
- Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a020412.

- Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C.J., and Barres, B.A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 641–646.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A.A., and Barres, B.A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* *468*, 562–566.
- Daniels, B.P., Holman, D.W., Cruz-Orengo, L., Jujjavarapu, H., Durrant, D.M., and Klein, R.S. (2014). Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *MBio* *5*, e01476–01414.
- Daood, M., Tsai, C., Ahdab-Barmada, M., and Watchko, J.F. (2008). ABC transporter (P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2) expression in the developing human CNS. *Neuropediatrics* *39*, 211–218.
- Darnell, J.E., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* *264*, 1415–1421.
- Dauchy, S., Dutheil, F., Weaver, R.J., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., Scherrmann, J.-M., De Waziers, I., and Declèves, X. (2008). ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J. Neurochem.* *107*, 1518–1528.
- Davis, T. (2014). *Pharmacology of the Blood Brain Barrier: Targeting CNS Disorders*.
- Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* *42*, 1007–1017.
- Declèves, X. (2009). Transport des anticancéreux par les transporteurs ABC et implications en hématologie.
- Declèves, X., Regina, A., Laplanche, J.L., Roux, F., Boval, B., Launay, J.M., and Scherrmann, J.M. (2000). Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* *60*, 594–601.
- Dehouck, M.P., Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., and Cecchelli, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* *54*, 1798–1801.
- Dejana, E., and Del Maschio, A. (1995). Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. *Thromb. Haemost.* *74*, 309–312.
- Dejana, E., Lampugnani, M.G., Martinez-Estrada, O., and Bazzoni, G. (2000). The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int. J. Dev. Biol.* *44*, 743–748.
- Deli, M.A., Abrahám, C.S., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell. Mol. Neurobiol.* *25*, 59–127.

- Dematteis, M., Julien, C., Guillermet, C., Sturm, N., Lantuejoul, S., Mallaret, M., Lévy, P., and Gozal, E. (2008). Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *177*, 227–235.
- Dempsey, J.A., Veasey, S.C., Morgan, B.J., and O'Donnell, C.P. (2010). Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol. Rev.* *90*, 47–112.
- Denk, A., Goebeler, M., Schmid, S., Berberich, I., Ritz, O., Lindemann, D., Ludwig, S., and Wirth, T. (2001). Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 28451–28458.
- Dente, C.J., Steffes, C.P., Speyer, C., and Tyburski, J.G. (2001). Pericytes augment the capillary barrier in in vitro cocultures. *J. Surg. Res.* *97*, 85–91.
- Diniz, B.S., Teixeira, A.L., Ojopi, E.B., Talib, L.L., Mendonça, V.A., Gattaz, W.F., and Forlenza, O.V. (2010). Higher serum sTNFR1 level predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. Jad* *22*, 1305–1311.
- Dombrowski, S.M., Desai, S.Y., Marroni, M., Cucullo, L., Goodrich, K., Bingaman, W., Mayberg, M.R., Benghez, L., and Janigro, D. (2001). Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* *42*, 1501–1506.
- Dopp, J.M., Mackenzie-Graham, A., Otero, G.C., and Merrill, J.E. (1997). Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J. Neuroimmunol.* *75*, 104–112.
- Durán, J., Esnaola, S., Rubio, R., and Iztueta, A. (2001). Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *163*, 685–689.
- Dutheil, F., Beaune, P., and Loriot, M.-A. (2008). Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie* *90*, 426–436.
- Dyrna, F., Hanske, S., Krueger, M., and Bechmann, I. (2013). The blood-brain barrier. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. Neuroimmune Pharmacol.* *8*, 763–773.
- Dyugovskaya, L., Polyakov, A., Ginsberg, D., Lavie, P., and Lavie, L. (2011). Molecular Pathways of Spontaneous and TNF- α -Mediated Neutrophil Apoptosis under Intermittent Hypoxia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *45*, 154–162.
- Ehrlich, P. (1885). *Das sauerstoffbedürfnis des organismus. Eine Farbenanalytische Studie.*
- Eigenmann, D.E., Xue, G., Kim, K.S., Moses, A.V., Hamburger, M., and Oufir, M. (2013). Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers Cns* *10*, 33.
- Eissner, G., Kolch, W., and Scheurich, P. (2004). Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* *15*, 353–366.

- Eltzschig, H.K., and Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and Inflammation. *N. Engl. J. Med.* 364, 656–665.
- Engelhardt, S., Al-Ahmad, A.J., Gassmann, M., and Ogunshola, O.O. (2014). Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 229, 1096–1105.
- Ericsson, A., Liu, C., Hart, R.P., and Sawchenko, P.E. (1995). Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J. Comp. Neurol.* 361, 681–698.
- Evans, W.H., and Martin, P.E.M. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol. Membr. Biol.* 19, 121–136.
- Fandrey, J., and Gassmann, M. (2009). Oxygen sensing and the activation of the hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)--invited article. *Adv. Exp. Med. Biol.* 648, 197–206.
- Felts, P.A., and Smith, K.J. (1996). Blood-brain barrier permeability in astrocyte-free regions of the central nervous system remyelinated by Schwann cells. *Neuroscience* 75, 643–655.
- Finkel, K.J., Searleman, A.C., Tymkew, H., Tanaka, C.Y., Saager, L., Safer-Zadeh, E., Bottros, M., Selvidge, J.A., Jacobsohn, E., Pulley, D., et al. (2009). Prevalence of undiagnosed obstructive sleep apnea among adult surgical patients in an academic medical center. *Sleep Med.* 10, 753–758.
- Fischer, S., Wobben, M., Kleinstück, J., Renz, D., and Schaper, W. (2000). Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C935–944.
- Fontaine, V., Mohand-Said, S., Hanoteau, N., Fuchs, C., Pfizenmaier, K., and Eisel, U. (2002). Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, RC216.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., et al. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* 183, 2593–2603.
- Franklin, K.A., and Lindberg, E. (2015). Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population—a review on the epidemiology of sleep apnea. *J. Thorac. Dis.* 7, 1311–1322.
- Franklin, K.A., Sahlin, C., Stenlund, H., and Lindberg, E. (2013). Sleep apnoea is a common occurrence in females. *Eur. Respir. J.* 41, 610–615.
- Frei, K., Siepl, C., Groscurth, P., Bodmer, S., Schwerdel, C., and Fontana, A. (1987). Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur. J. Immunol.* 17, 1271–1278.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.

- Gaete, P.S., Lillo, M.A., and Figueroa, X.F. (2014). Functional role of connexins and pannexins in the interaction between vascular and nervous system. *J. Cell. Physiol.* 229, 1336–1345.
- Garcia, J.G., Davis, H.W., and Patterson, C.E. (1995). Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J. Cell. Physiol.* 163, 510–522.
- Giles, T.L., Lasserson, T.J., Smith, B.J., White, J., Wright, J., and Cates, C.J. (2006). Continuous positive airways pressure for obstructive sleep apnoea in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001106.
- Goldbart, A., Row, B.W., Kheirandish, L., Schurr, A., Gozal, E., Guo, S.Z., Payne, R.S., Cheng, Z., Brittan, K.R., and Gozal, D. (2003). Intermittent hypoxic exposure during light phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. *Neuroscience* 122, 585–590.
- Goldmann, E.E. (1913). Vitalfarbung am zentralnervensystem. *Abhandl Konigl preuss.*
- Gosselet, F., Candela, P., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2011). La barrière hémato-encéphalique - Une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer ? *Med Sci (Paris)* 27, 987–992.
- Gozal, E., Sachleben, L.R., Rane, M.J., Vega, C., and Gozal, D. (2005). Mild sustained and intermittent hypoxia induce apoptosis in PC-12 cells via different mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C535–542.
- Granet, C., and Miossec, P. (2004). Combination of the pro-inflammatory cytokines IL-1, TNF- α and IL-17 leads to enhanced expression and additional recruitment of AP-1 family members, Egr-1 and NF- κ B in osteoblast-like cells. *Cytokine* 26, 169–177.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793–802.
- Grieb, P., Forster, R.E., Strome, D., Goodwin, C.W., and Pape, P.C. (1985). O₂ exchange between blood and brain tissues studied with 18O₂ indicator-dilution technique. *J. Appl. Physiol.* 58, 1929–1941.
- Grilli, M., Chen-Tran, A., and Lenardo, M.J. (1993). Tumor necrosis factor α mediates a T cell receptor-independent induction of the gene regulatory factor NF- κ B in T lymphocytes. *Mol. Immunol.* 30, 1287–1294.
- Grimm, S., and Baeuerle, P.A. (1993). The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem. J.* 290, 297–308.
- Guilleminault, C., Tilkian, A., and Dement, W.C. (1976). The sleep apnea syndromes. *Annu. Rev. Med.* 27, 465–484.
- Gupta, M.A., Simpson, F.C., and Lyons, D.C.A. (2016). The effect of treating obstructive sleep apnea with positive airway pressure on depression and other subjective symptoms: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med. Rev.* 28, 55–68.

- Guven-Maiorov, E., Acuner-Ozbabacan, S.E., Keskin, O., Gursoy, A., and Nussinov, R. (2014). Structural Pathways of Cytokines May Illuminate Their Roles in Regulation of Cancer Development and Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 6, 663–683.
- Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R.G., and Cole, S.P.C. (2004). The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.* 5, 21–53.
- Haj-Yasein, N.N., Vindedal, G.F., Eilert-Olsen, M., Gundersen, G.A., Skare, Ø., Laake, P., Klungland, A., Thorén, A.E., Burkhardt, J.M., Ottersen, O.P., et al. (2011). Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17815–17820.
- Hartz, A.M.S., Bauer, B., Fricker, G., and Miller, D.S. (2006). Rapid modulation of P-glycoprotein-mediated transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Mol. Pharmacol.* 69, 462–470.
- Haseloff, R.F., Blasig, I.E., Bauer, H.C., and Bauer, H. (2005). In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 25–39.
- Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173–185.
- Hawkins, B.T., Sykes, D.B., and Miller, D.S. (2010). Rapid, reversible modulation of blood-brain barrier P-glycoprotein transport activity by vascular endothelial growth factor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 1417–1425.
- Hawkins, R.A., DeJoseph, M.R., and Hawkins, P.A. (1995). Regional brain glutamate transport in rats at normal and raised concentrations of circulating glutamate. *Cell Tissue Res.* 281, 207–214.
- Hawkins, R.A., O’Kane, R.L., Simpson, I.A., and Viña, J.R. (2006). Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J. Nutr.* 136, 218S–26S.
- Hayashi, K., Nakao, S., Nakaoke, R., Nakagawa, S., Kitagawa, N., and Niwa, M. (2004). Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood–brain barrier. *Regul. Pept.* 123, 77–83.
- He, Y., Yao, Y., Tsirka, S.E., and Cao, Y. (2014). Cell-Culture Models of the Blood–Brain Barrier. *Stroke J. Cereb. Circ.* 45, 2514–2526.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1–20.
- Heinzer, R., Vat, S., Marques-Vidal, P., Marti-Soler, H., Andries, D., Tobback, N., Mooser, V., Preisig, M., Malhotra, A., Waeber, G., et al. (2015). Prevalence of sleep-disordered breathing in the general population: the HypnoLaus study. *Lancet Respir. Med.* 3, 310–318.
- Helms, H.C., Abbott, N.J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P.-O., Deli, M.A., Förster, C., Galla, H.J., Romero, I.A., Shusta, E.V., et al. (2016). In vitro models of the blood–brain barrier:

An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 862–890.

Herwaarden, A. van, Jonker, J.W., Wagenaar, E., Brinkhuis, R.F., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H., and Schinkel, A.H. (2003). The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res.* 63, 6447–6452.

Hickey, W.F. (2001). Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36, 118–124.

Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K.H., and Kishimoto, T. (1985). Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5490–5494.

Hofer, T., Wenger, H., and Gassmann, M. (2002). Oxygen sensing, HIF-1alpha stabilization and potential therapeutic strategies. *Pflugers Arch.* 443, 503–507.

Hori, S., Ohtsuki, S., Hosoya, K., Nakashima, E., and Terasaki, T. (2004). A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J. Neurochem.* 89, 503–513.

Hot, A., Lenief, V., and Miossec, P. (2012). Combination of IL-17 and TNF α induces a pro-inflammatory, pro-coagulant and pro-thrombotic phenotype in human endothelial cells. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 768–776.

Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495–504.

Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., and Goeddel, D.V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299–308.

Htoo, A.K., Greenberg, H., Tongia, S., Chen, G., Henderson, T., Wilson, D., and Liu, S.F. (2006). Activation of nuclear factor kappaB in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 10, 43–50.

Hu, J.-G., Wang, X.-F., Zhou, J.-S., Wang, F.-C., Li, X.-W., and Lü, H.-Z. (2010). Activation of PKC-alpha is required for migration of C6 glioma cells. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 70, 239–245.

Huang, J., Upadhyay, U.M., and Tamargo, R.J. (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg. Neurol.* 66, 232–245.

Huang, Y.-S., Guilleminault, C., Hwang, F.-M., Cheng, C., Lin, C.-H., Li, H.-Y., and Lee, L.-A. (2016). Inflammatory cytokines in pediatric obstructive sleep apnea. *Medicine (Baltimore)* 95.

Huber, J.D., Witt, K.A., Hom, S., Egleton, R.D., Mark, K.S., and Davis, T.P. (2001). Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H1241–1248.

- Huber, J.D., Hau, V.S., Borg, L., Campos, C.R., Egleton, R.D., and Davis, T.P. (2002). Blood-brain barrier tight junctions are altered during a 72-h exposure to lambda-carrageenan-induced inflammatory pain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *283*, H1531–1537.
- Huppert, J., Closhen, D., Croxford, A., White, R., Kulig, P., Pietrowski, E., Bechmann, I., Becher, B., Luhmann, H.J., Waisman, A., et al. (2009). Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *Faseb J.* *24*, 1023–1034.
- Iftikhar, I.H., Bittencourt, L., Youngstedt, S.D., Ayas, N., Cistulli, P., Schwab, R., Durkin, M.W., and Magalang, U.J. (2017). Comparative efficacy of CPAP, MADs, exercise-training, and dietary weight loss for sleep apnea: a network meta-analysis. *Sleep Med.* *30*, 7–14.
- Inoko, A., Itoh, M., Tamura, A., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *8*, 837–845.
- Irwin, M. (2002). Effects of sleep and sleep loss on immunity and cytokines. *Brain. Behav. Immun.* *16*, 503–512.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., et al. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* *292*, 468–472.
- Jackson, S., Meeks, C., Vézina, A., Robey, R.W., Tanner, K., and Gottesman, M.M. (2019). Model systems for studying the blood-brain barrier: Applications and challenges. *Biomaterials* *214*, 119217.
- Jaeger, C.B., and Blight, A.R. (1997). Spinal Cord Compression Injury in Guinea Pigs: Structural Changes of Endothelium and Its Perivascular Cell Associations after Blood–Brain Barrier Breakdown and Repair. *Exp. Neurol.* *144*, 381–399.
- Jagodinsky, J.C., and Akgun, U. (2015). Characterizing the binding interactions between P-glycoprotein and eight known cardiovascular transport substrates. *Pharmacol. Res. Perspect.* *3*, e00114.
- Janzer, R.C., and Raff, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* *325*, 253–257.
- Jian Liu, K., and Rosenberg, G.A. (2005). Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* *39*, 71–80.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., and Smyth, M.J. (2000). Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem. Sci.* *25*, 1–6.
- Jones, S.A., Scheller, J., and Rose-John, S. (2011). Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J. Clin. Invest.* *121*, 3375–3383.
- Jonker, J.W., Smit, J.W., Brinkhuis, R.F., Maliepaard, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., and Schinkel, A.H. (2000). Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 1651–1656.

Jordan, W., Cohrs, S., Degner, D., Meier, A., Rodenbeck, A., Mayer, G., Pilz, J., R  ther, E., Kornhuber, J., and Bleich, S. (2006). Evaluation of oxidative stress measurements in obstructive sleep apnea syndrome. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* 113, 239–254.

Juliano, R.L., and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152–162.

Jullian-Desayes, I., Joyeux-Faure, M., Tamisier, R., Launois, S., Borel, A.-L., Levy, P., and Pepin, J.-L. (2015). Impact of obstructive sleep apnea treatment by continuous positive airway pressure on cardiometabolic biomarkers: a systematic review from sham CPAP randomized controlled trials. *Sleep Med Rev* 21, 23–38.

Jullian-Desayes, I., Launois, S.H., Pépin, J.L., and Joyeux-Faure, M. (2016). Biomarqueurs sanguins et urinaires chez les patients atteints d’un syndrome d’apnées obstructives du sommeil (SAOS) : comment juger de l’efficacité de la pression positive continue (PPC) ? *Médecine Sommeil* 13, 65–71.

Kallio, P.J., Wilson, W.J., O’Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. (1999). Regulation of the Hypoxia-inducible Transcription Factor 1 α by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 6519–6525.

Kaushal, N., Ramesh, V., and Gozal, D. (2012). TNF- α and Temporal Changes in Sleep Architecture in Mice Exposed to Sleep Fragmentation. *Plos One* 7.

Keaney, J., and Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *Febs J.* 282, 4067–4079.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13, 1173–1175.

Keller, A. (2013). Breaking and building the wall: the biology of the blood-brain barrier in health and disease. *Swiss Med. Wkly.* 143, w13892.

Kempe, S., Kestler, H., Lasar, A., and Wirth, T. (2005). NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res.* 33, 5308–5319.

Kerner, N.A., and Roose, S.P. (2016). Obstructive Sleep Apnea is Linked to Depression and Cognitive Impairment: Evidence and Potential Mechanisms. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry* 24, 496–508.

Kheirandish-Gozal, L., and Gozal, D. (2019). Obstructive Sleep Apnea and Inflammation: Proof of Concept Based on Two Illustrative Cytokines. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

Kheirandish-Gozal, L., Sahib, A.K., Macey, P.M., Philby, M.F., Gozal, D., and Kumar, R. (2018). Regional brain tissue integrity in pediatric obstructive sleep apnea. *Neurosci. Lett.* 682, 118–123.

Kheirandish-Gozal, L., Tan, H.-L., and Gozal, D. (2019). Sleep-Related Breathing Disorders and Inflammation: TNF- α and IL-6 as Prototypic Examples. In *Allergy and Sleep: Basic*

Principles and Clinical Practice, A. Fishbein, and S.H. Sheldon, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 227–245.

Kim, K.S., Wass, C.A., Cross, A.S., and Opal, S.M. (1992). Modulation of blood-brain barrier permeability by tumor necrosis factor and antibody to tumor necrosis factor in the rat. *Lymphokine Cytokine Res.* *11*, 293–298.

Kim, L.J., Martinez, D., Fiori, C.Z., Baronio, D., Kretzmann, N.A., and Barros, H.M.T. (2015). Hypomyelination, memory impairment, and blood-brain barrier permeability in a model of sleep apnea. *Brain Res.* *1597*, 28–36.

Kimelberg, H.K. (2004). Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience* *129*, 851–860.

Kishimoto, T., Akira, S., and Taga, T. (1992). Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* *258*, 593–597.

Knowles, H.J., Tian, Y.-M., Mole, D.R., and Harris, A.L. (2004). Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ. Res.* *95*, 162–169.

Kogo, J., Takeba, Y., Kumai, T., Kitaoka, Y., Matsumoto, N., Ueno, S., and Kobayashi, S. (2006). Involvement of TNF-alpha in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res.* *1122*, 201–208.

Kruh, G.D., and Belinsky, M.G. (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* *22*, 7537–7552.

Kubota, H., Ishihara, H., Langmann, T., Schmitz, G., Stieger, B., Wieser, H.-G., Yonekawa, Y., and Frei, K. (2006). Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res.* *68*, 213–228.

Lakhan, S.E., Kirchgessner, A., Tepper, D., and Aidan, L. (2013). Matrix Metalloproteinases and Blood-Brain Barrier Disruption in Acute Ischemic Stroke. *Front. Neurol.* *4*.

Lavie, L. (2015). Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med. Rev.* *20*, 27–45.

Lavie, L., and Lavie, P. (2009). Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur. Respir. J.* *33*, 1467–1484.

Lee, E.J., Hung, Y.C., and Lee, M.Y. (1999). Early alterations in cerebral hemodynamics, brain metabolism, and blood-brain barrier permeability in experimental intracerebral hemorrhage. *J. Neurosurg.* *91*, 1013–1019.

Lee, G., Dallas, S., Hong, M., and Bendayan, R. (2001). Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol. Rev.* *53*, 569–596.

- Lee, G., Babakhanian, K., Ramaswamy, M., Prat, A., Wosik, K., and Bendayan, R. (2007). Expression of the ATP-binding cassette membrane transporter, ABCG2, in human and rodent brain microvessel endothelial and glial cell culture systems. *Pharm. Res.* *24*, 1262–1274.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., and Cole, S.P.C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *204*, 216–237.
- Lévy, P., Kohler, M., McNicholas, W.T., Barbé, F., McEvoy, R.D., Somers, V.K., Lavie, L., and Pépin, J.-L. (2015). Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* *1*, 15015.
- Lewandowski, M. (1900). Zur lehre von der cerebrospinalflussigkeit. *Zeitschrift fur Klinische Psychologie Psychiatrie Und Psychotherapie*.
- Libby, P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr. Rev.* *65*, S140–146.
- Lieberman, A.P., Pitha, P.M., Shin, H.S., and Shin, M.L. (1989). Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 6348–6352.
- Lim, D.C., and Pack, A.I. (2014). Obstructive sleep apnea and cognitive impairment: Addressing the blood–brain barrier. *Sleep Med. Rev.* *18*, 35–48.
- Linton, K.J., and Higgins, C.F. (2007). Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch.* *453*, 555–567.
- Löscher, W. (2005). How to Explain Multidrug Resistance in Epilepsy? *Epilepsy Curr.* *5*, 107–112.
- Löscher, W., and Potschka, H. (2002). Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *301*, 7–14.
- Luissint, A.-C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., and Couraud, P.-O. (2012). Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers Cns* *9*, 23.
- Macey, P.M., Prasad, J.P., Ogren, J.A., Moiyadi, A.S., Aysola, R.S., Kumar, R., Yan-Go, F.L., Woo, M.A., Albert Thomas, M., and Harper, R.M. (2018). Sex-specific hippocampus volume changes in obstructive sleep apnea. *Neuroimage Clin.* *20*, 305–317.
- Maddur, M.S., Miossec, P., Kaveri, S.V., and Bayry, J. (2012). Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am. J. Pathol.* *181*, 8–18.
- Manukhina, E.B., Downey, H.F., Shi, X., and Mallet, R.T. (2016). Intermittent hypoxia training protects cerebrovascular function in Alzheimer’s disease. *Exp. Biol. Med.* *241*, 1351–1363.
- März, P., Otten, U., and Rose-John, S. (1999). Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 2995–3004.

- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., and Ottersen, O.P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58, 1094–1103.
- Maxwell, P.H., and Ratcliffe, P.J. (2002). Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 29–37.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275.
- McAllister, M.S., Krizanac-Bengez, L., Macchia, F., Naftalin, R.J., Pedley, K.C., Mayberg, M.R., Marroni, M., Leaman, S., Stanness, K.A., and Janigro, D. (2001). Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res.* 904, 20–30.
- Megyeri, P., Ábrahám, C.S., Temesvári, P., Kovács, J., Vas, T., and Speer, C.P. (1992). Recombinant human tumor necrosis factor α constricts pial arterioles and increases blood-brain barrier permeability in newborn piglets. *Neurosci. Lett.* 148, 137–140.
- Meier-Ewert, H.K., Ridker, P.M., Rifai, N., Regan, M.M., Price, N.J., Dinges, D.F., and Mullington, J.M. (2004). Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 678–683.
- Meister, A. (1994). Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res.* 54, 1969s–1975s.
- Melillo, G. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 inhibitors. *Methods Enzymol.* 435, 385–402.
- Mi, H., Haerberle, H., and Barres, B.A. (2001). Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 1538–1547.
- Mills, K.H.G. (2008). Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 2636–2649.
- Minagar, A., and Alexander, J.S. (2003). Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 9, 540–549.
- Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J., and Michiels, C. (1999). Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1 α -Hsp90 interaction. *Febs Lett.* 460, 251–256.
- Minoves, M., Morand, J., Perriot, F., Chatard, M., Gonthier, B., Lemarié, E., Menut, J.-B., Polak, J., Pépin, J.-L., Godin-Ribuot, D., et al. (2017). An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast Po₂ oscillations with minimal gas consumption. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 313, C460–C468.
- Miossec, P., and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 763–776.
- Miossec, P., Korn, T., and Kuchroo, V.K. (2009). Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 361, 888–898.

- Mullington, J.M., Simpson, N.S., Meier-Ewert, H.K., and Haack, M. (2010). Sleep loss and inflammation. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *24*, 775–784.
- Murphy, M., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1988). Effects of recombinant tumor necrosis factor, lymphotoxin, and immune interferon on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic precursor cells. *Exp. Hematol.* *16*, 131–138.
- Nácher, M., Farré, R., Montserrat, J.M., Torres, M., Navajas, D., Bulbena, O., and Serrano-Mollar, A. (2009). Biological consequences of oxygen desaturation and respiratory effort in an acute animal model of obstructive sleep apnea (OSA). *Sleep Med.* *10*, 892–897.
- Nadeau, S., and Rivest, S. (1999). Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *58*, 61–77.
- Nadeem, R., Molnar, J., Madbouly, E.M., Nida, M., Aggarwal, S., Sajid, H., Naseem, J., and Loomba, R. (2013). Serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *J. Clin. Sleep Med. Jcsm Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* *9*, 1003–1012.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., and Togari, A. (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 277–290.
- Naik, P., and Cucullo, L. (2012). In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J. Pharm. Sci.* *101*, 1337–1354.
- Nakahara, H., Song, J., Sugimoto, M., Hagihara, K., Kishimoto, T., Yoshizaki, K., and Nishimoto, N. (2003). Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *48*, 1521–1529.
- Navarrete-Opazo, A., and Mitchell, G.S. (2014). Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *307*, R1181–R1197.
- Neuhaus, W., Gaiser, F., Mahringer, A., Franz, J., Riethmüller, C., and Färster, C. (2014). The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.
- Nichols, J.R., Aldrich, A.L., Mariani, M.M., Vidlak, D., Esen, N., and Kielian, T. (2009). TLR2 Deficiency Leads to Increased Th17 Infiltrates in Experimental Brain Abscesses. *J. Immunol.* *182*, 7119–7130.
- Nies, A.T., Jedlitschky, G., König, J., Herold-Mende, C., Steiner, H.H., Schmitt, H.-P., and Keppler, D. (2004). Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* *129*, 349–360.
- Nishitsuji, K., Hosono, T., Nakamura, T., Bu, G., and Michikawa, M. (2011). Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model. *J. Biol. Chem.* *286*, 17536–17542.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* *161*, 653–660.

- Noack, M., and Miossec, P. (2014). Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* *13*, 668–677.
- O’Kane, R.L., Viña, J.R., Simpson, I., Zaragozá, R., Mokashi, A., and Hawkins, R.A. (2006). Cationic amino acid transport across the blood-brain barrier is mediated exclusively by system y⁺. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *291*, E412–419.
- Ogunshola, O.O. (2011). In vitro modeling of the blood-brain barrier: simplicity versus complexity. *Curr. Pharm. Des.* *17*, 2755–2761.
- Ogunshola, O.O., and Al-Ahmad, A. (2012). HIF-1 at the blood-brain barrier: a mediator of permeability? *High Alt. Med. Biol.* *13*, 153–161.
- Ohga, E., Tomita, T., Wada, H., Yamamoto, H., Nagase, T., and Ouchi, Y. (2003). Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *94*, 179–184.
- Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2007). Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.* *24*, 1745–1758.
- Osburg, B., Peiser, C., Dömling, D., Schomburg, L., Ko, Y.T., Voigt, K., and Bickel, U. (2002). Effect of endotoxin on expression of TNF receptors and transport of TNF-alpha at the blood-brain barrier of the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *283*, E899–908.
- Palomares, J.A., Tummala, S., Wang, D.J.J., Park, B., Woo, M.A., Kang, D.W., Lawrence, K.S.S., Harper, R.M., and Kumar, R. (2015). Water Exchange across the Blood-Brain Barrier in Obstructive Sleep Apnea: An MRI Diffusion-Weighted Pseudo-Continuous Arterial Spin Labeling Study: Altered BBB Function in OSA. *J. Neuroimaging* *25*, 900–905.
- Parashar, A., Kumar, R., Correspondence, A., and Parashar, K. (2012). A Review on Novel Techniques for Drug Delivery to the Brain. *Curr. Res. Pharm. Sci.* *03*, 134–141.
- Pardridge, W.M. (2003). Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol. Interv.* *3*, 90–105, 51.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* *6*, 1133–1141.
- Peppard, P.E., Young, T., Palta, M., and Skatrud, J. (2000). Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.* *342*, 1378–1384.
- Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., and Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* *443*, 700–704.
- Perek, N., and Denoyer, D. (2002). The multidrug resistance mechanisms and their interactions with the radiopharmaceutical probes used for an in vivo detection. *Curr. Drug Metab.* *3*, 97–113.
- Pérez-Cerdá, F., Sánchez-Gómez, M.V., and Matute, C. (2015). Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Front. Neuroanat.* *9*.

- Perry, R.T., Collins, J.S., Wiener, H., Acton, R., and Go, R.C. (2001). The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22, 873–883.
- Persidsky, Y., Stins, M., Way, D., Witte, M.H., Weinand, M., Kim, K.S., Bock, P., Gendelman, H.E., and Fiala, M. (1997). A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis. *J. Immunol. Baltim. Md* 158, 3499–3510.
- Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., and Kanmogne, G.D. (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. Neuroimmune Pharmacol.* 1, 223–236.
- Petty, M.A., and Lo, E.H. (2002). Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog. Neurobiol.* 68, 311–323.
- Phillips, S.A., Olson, E.B., Morgan, B.J., and Lombard, J.H. (2004). Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H388–393.
- Poller, B., Drewe, J., Krähenbühl, S., Huwyler, J., and Gutmann, H. (2010). Regulation of BCRP (ABCG2) and P-Glycoprotein (ABCB1) by Cytokines in a Model of the Human Blood–Brain Barrier. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 63–70.
- Potschka, H. (2010). Targeting regulation of ABC efflux transporters in brain diseases: A novel therapeutic approach. *Pharmacol. Ther.* 125, 118–127.
- Prabhakarandian, B., Shen, M.-C., Nichols, J.B., Mills, I.R., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Aschner, M., and Pant, K. (2013). SyM-BBB: a microfluidic Blood Brain Barrier model. *Lab. Chip* 13, 1093–1101.
- Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K., and Antel, J.P. (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36, 145–155.
- Prudhomme, J.G., Sherman, I.W., Land, K.M., Moses, A.V., Stenglein, S., and Nelson, J.A. (1996). Studies of *Plasmodium falciparum* cytoadherence using immortalized human brain capillary endothelial cells. *Int. J. Parasitol.* 26, 647–655.
- Puech, C., Delavenne, X., and Perek, N. (2018a). The expected characteristics of an in vitro human Blood Brain Barrier model derived from cell lines, for studying how ABC transporters influence drug permeability. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 45, 159–167.
- Puech, C., Hodin, S., Forest, V., He, Z., Mismetti, P., Delavenne, X., and Perek, N. (2018b). Assessment of HBEC-5i endothelial cell line cultivated in astrocyte conditioned medium as a human blood-brain barrier model for ABC drug transport studies. *Int. J. Pharm.* 551, 281–289.
- Punjabi, N.M., and Beamer, B.A. (2007). C-reactive protein is associated with sleep disordered breathing independent of adiposity. *Sleep* 30, 29–34.
- Rascher, G., Fischmann, A., Kröger, S., Duffner, F., Grote, E.-H., and Wolburg, H. (2002). Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 104, 85–91.

- Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* *34*, 207–217.
- Robey, R.W., To, K.K.K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., and Bates, S.E. (2009). ABCG2: a perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *61*, 3–13.
- Roche, F., Gaspoz, J.-M., Pichot, V., Picard-Kossovsky, M., Maudoux, D., Garcin, A., Celle, S., Sforza, E., Barthélémy, J.C., and PROOF and SYNAPSE Study Groups (2009). Association between C-reactive protein and unrecognised sleep-disordered breathing in the elderly. *Eur. Respir. J.* *33*, 797–803.
- Rochfort, K.D., and Cummins, P.M. (2015). Cytokine-mediated dysregulation of zonula occludens-1 properties in human brain microvascular endothelium. *Microvasc. Res.* *100*, 48–53.
- Rochfort, K.D., Collins, L.E., McLoughlin, A., and Cummins, P.M. (2016). Tumour necrosis factor- α -mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *J. Neurochem.* *136*, 564–572.
- Rock, R.B., and Peterson, P.K. (2006). Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. Neuroimmune Pharmacol.* *1*, 117–126.
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., et al. (1997). Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* *6*, 315–325.
- Ronaldson, P.T., and Davis, T.P. (2015). Targeting transporters: promoting blood-brain barrier repair in response to oxidative stress injury. *Brain Res.* *1623*, 39–52.
- Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G., and Jones, S.A. (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 227–236.
- Rosenzweig, I., Glasser, M., Polsek, D., Leschziner, G.D., Williams, S.C.R., and Morrell, M.J. (2015). Sleep apnoea and the brain: a complex relationship. *Lancet Respir. Med.* *3*, 404–414.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M., and Goeddel, D.V. (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* *269*, 1424–1427.
- Rubin, L.L., Hall, D.E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H.C., Janatpour, M., Liaw, C.W., Manning, K., and Morales, J. (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* *115*, 1725–1735.
- Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D., and Beyer, E.C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* *83*, 1359–1400.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4131–4142.

- Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., and Tsukita, S. (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell Biol.* *137*, 1393–1401.
- Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* *272*, 22642–22647.
- Sandoval, K.E., and Witt, K.A. (2008). Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.* *32*, 200–219.
- Saunders, N.R., Knott, G.W., and Dziegielewska, K.M. (2000). Barriers in the immature brain. *Cell. Mol. Neurobiol.* *20*, 29–40.
- Savettieri, G., Di Liegro, I., Catania, C., Licata, L., Pitarresi, G.L., D'Agostino, S., Schiera, G., De Caro, V., Giandalia, G., Giannola, L.I., et al. (2000). Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport* *11*, 1081–1084.
- Sawyer, A.M., Gooneratne, N.S., Marcus, C.L., Ofer, D., Richards, K.C., and Weaver, T.E. (2011). A systematic review of CPAP adherence across age groups: clinical and empiric insights for developing CPAP adherence interventions. *Sleep Med. Rev.* *15*, 343–356.
- Schaefer, E., Wu, W., Mark, C., Yang, A., DiGiacomo, E., Carlton-Smith, C., Salloum, S., Brisac, C., Lin, W., Corey, K.E., et al. (2017). Intermittent hypoxia is a proinflammatory stimulus resulting in IL-6 expression and M1 macrophage polarization. *Hepatology* *1*, 326–337.
- Schinkel, A.H. (2001). The roles of P-glycoprotein and MRP1 in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Adv. Exp. Med. Biol.* *500*, 365–372.
- Schinkel, A.H., and Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *55*, 3–29.
- Schneeberger, E.E., and Lynch, R.D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *286*, C1213–1228.
- Schroeter, M.L., Mertsch, K., Giese, H., Müller, S., Sporbart, A., Hickel, B., and Blasig, I.E. (1999). Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. *FEBS Lett.* *449*, 241–244.
- Sedlakova, R., Shivers, R.R., and Del Maestro, R.F. (1999). Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* *31*, 149–161.
- Semenza, G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* *64*, 993–998.
- Sforza, E., and Roche, F. (2016). Chronic intermittent hypoxia and obstructive sleep apnea: an experimental and clinical approach. *Hypoxia Auckl. Nz* *4*, 99–108.
- Sforza, E., Roche, F., Thomas-Anterion, C., Kerleroux, J., Beauchet, O., Celle, S., Maudoux, D., Pichot, V., Laurent, B., and Barthélémy, J.C. (2010). Cognitive Function and Sleep Related Breathing Disorders in a Healthy Elderly Population: the Synapse Study. *Sleep* *33*, 515–521.

Shamsuzzaman, A.S.M., Winnicki, M., Lanfranchi, P., Wolk, R., Kara, T., Accurso, V., and Somers, V.K. (2002). Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* *105*, 2462–2464.

Sharom, F.J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* *50*, 161–178.

Sharples, L.D., Clutterbuck-James, A.L., Glover, M.J., Bennett, M.S., Chadwick, R., Pittman, M.A., and Quinnett, T.G. (2016). Meta-analysis of randomised controlled trials of oral mandibular advancement devices and continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea-hypopnoea. *Sleep Med. Rev.* *27*, 108–124.

Shen, H.-M., and Pervaiz, S. (2006). TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 1589–1598.

Simpson, I.A., Carruthers, A., and Vannucci, S.J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *27*, 1766–1791.

Société de Pneumologie de Langue Française (2010). Société de Pneumologie de Langue Française, Société Française d'Anesthésie Réanimation, Société Française de Cardiologie, Société Française de Médecine du Travail, Société Française d'Otho-Rhino-Laryngologie et de chirurgie de la face et du cou, Société de Physiologie, Société Française de Recherche et de Médecine du Sommeil. Recommandations pour la pratique clinique du syndrome d'apnées hypopnées du sommeil. *Rev. Mal. Respir.* *27*, 806–833.

Somers, V.K., Dyken, M.E., Mark, A.L., and Abboud, F.M. (1993). Sympathetic-nerve activity during sleep in normal subjects. *N. Engl. J. Med.* *328*, 303–307.

Somers, V.K., White, D.P., Amin, R., Abraham, W.T., Costa, F., Culebras, A., Daniels, S., Floras, J.S., Hunt, C.E., Olson, L.J., et al. (2008). Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation* *118*, 1080–1111.

Sorani, M.D., Manley, G.T., and Giacomini, K.M. (2008). Genetic variation in human aquaporins and effects on phenotypes of water homeostasis. *Hum. Mutat.* *29*, 1108–1117.

Stewart, P.A., and Wiley, M.J. (1981). Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* *84*, 183–192.

Stowe, A.M., Altay, T., Freie, A.B., and Gidday, J.M. (2011). Repetitive hypoxia extends endogenous neurovascular protection for stroke. *Ann. Neurol.* *69*, 975–985.

Strohl, K.P. (1996). Tumor necrosis factor and sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *153*, 893.

- Suzuki, S., Tanaka, K., and Suzuki, N. (2009). Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 464–479.
- Tam, C.S., Wong, M., Tam, K., Aouad, L., and Waters, K.A. (2007). The Effect of Acute Intermittent Hypercapnic Hypoxia Treatment on IL-6, TNF- α , and CRP Levels in Piglets. *Sleep* 30, 723–727.
- Tansey, M.G., and Wyss-Coray, T. (2008). Cytokines in CNS Inflammation and Disease. In *Central Nervous System Diseases and Inflammation*, T.E. Lane, M. Carson, C. Bergmann, and T. Wyss-Coray, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 59–106.
- Tauman, R., Ivanenko, A., O'Brien, L.M., and Gozal, D. (2004). Plasma C-Reactive Protein Levels Among Children With Sleep-Disordered Breathing. *Pediatrics* 113, e564–e569.
- Von Tell, D., Armulik, A., and Betsholtz, C. (2006). Pericytes and vascular stability. *Exp. Cell Res.* 312, 623–629.
- Tilling, T., Engelbertz, C., Decker, S., Korte, D., Hüwel, S., and Galla, H.-J. (2002). Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. *Cell Tissue Res.* 310, 19–29.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., and Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2, 222–228.
- Tong, X.K., and Hamel, E. (1999). Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92, 163–175.
- Tontsch, U., and Bauer, H.C. (1991). Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 539, 247–253.
- Tracey, K.J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853–859.
- Tucker, I.G., Yang, L., and Mujoo, H. (2012). Delivery of drugs to the brain via the blood brain barrier using colloidal carriers. *J. Microencapsul.* 29, 475–486.
- Tuttolomondo, A., Di Raimondo, D., di Sciacca, R., Pinto, A., and Licata, G. (2008). Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr. Pharm. Des.* 14, 3574–3589.
- Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J., and Terasaki, T. (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J. Neurochem.* 117, 333–345.
- Unnikrishnan, D., Jun, J., and Polotsky, V. (2015). Inflammation in sleep apnea: An update. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16, 25–34.
- Vandenhoute, E., Dehouck, L., Boucau, M.-C., Sevin, E., Uzbekov, R., Tardivel, M., Gosselet, F., Fenart, L., Cecchelli, R., and Dehouck, M.-P. (2011). Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes. *Curr. Neurovasc. Res.* 8, 258–269.

- Varatharaj, A., and Galea, I. (2017). The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain. Behav. Immun.* *60*, 1–12.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D.W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics* *3*, 281–290.
- Vaucher, E., Tong, X.K., Cholet, N., Lantin, S., and Hamel, E. (2000). GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J. Comp. Neurol.* *421*, 161–171.
- Vautier, S., Fernandez, C., Milane, A., Lacomblez, L., Davrinche, C., and Farinotti, R. (2006). ABCB1 (P-glycoprotein) and blood-brain barrier: role in neurological diseases and their treatments. *J. Pharm. Clin.* *25*, 225–235.
- Venneti, S., Wiley, C.A., and Kofler, J. (2009). Imaging microglial activation during neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. Neuroimmune Pharmacol.* *4*, 227–243.
- Verges, S., Chacaroun, S., Godin-Ribuot, D., and Baillieul, S. (2015). Hypoxic Conditioning as a New Therapeutic Modality. *Front. Pediatr.* *3*.
- Verkman, A.S. (2002). Aquaporin water channels and endothelial cell function. *J. Anat.* *200*, 617–627.
- De Vries, H.E., Blom-Roosemalen, M.C.M., Oosten, M. van, de Boer, A.G., van Berkel, T.J.C., Breimer, D.D., and Kuiper, J. (1996). The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J. Neuroimmunol.* *64*, 37–43.
- Van Wagoner, N.J., and Benveniste, E.N. (1999). Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* *100*, 124–139.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., and Boldin, M.P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 331–367.
- Wang, C.X., and Shuaib, A. (2007). Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Prog. Neurobiol.* *83*, 140–148.
- Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* *268*, 21513–21518.
- Ware, C.F. (2005). Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 787–819.
- Warren, M.S., Zerangue, N., Woodford, K., Roberts, L.M., Tate, E.H., Feng, B., Li, C., Feuerstein, T.J., Gibbs, J., Smith, B., et al. (2009). Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacol. Res.* *59*, 404–413.
- Watanabe, T., Dohgu, S., Takata, F., Nishioku, T., Nakashima, A., Futagami, K., Yamauchi, A., and Kataoka, Y. (2013). Paracellular barrier and tight junction protein expression in the

immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 492–495.

Weidenfeller, C., Svendsen, C.N., and Shusta, E.V. (2007). Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J. Neurochem.* 101, 555–565.

West, S.D., and Turnbull, C. (2018). Obstructive sleep apnoea. *Eye Lond. Engl.* 32, 889–903.

Wilhelm, I., and Krizbai, I.A. (2014). In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier for the Study of Drug Delivery to the Brain. *Mol. Pharm.* 11, 1949–1963.

Wilhelm, I., Fazakas, C., and Krizbai, I.A. (2011). In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 71, 113–128.

Williams, A., and Scharf, S.M. (2007). Obstructive sleep apnea, cardiovascular disease, and inflammation—is NF- κ B the key? *Sleep Breath.* 11, 69–76.

Williams, E.J., Williams, G., Howell, F.V., Skaper, S.D., Walsh, F.S., and Doherty, P. (2001). Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J. Biol. Chem.* 276, 43879–43886.

Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., et al. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* 8, 950–957.

Winkler, E.A., Bell, R.D., and Zlokovic, B.V. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* 14, 1398–1405.

Wuest, D.M., and Lee, K.H. (2012). Optimization of endothelial cell growth in a murine in vitro blood-brain barrier model. *Biotechnol. J.* 7, 409–417.

Xia, X., and Kung, A.L. (2009). Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia. *Genome Biol.* 10, R113.

Xiao-Dong, L., Zhi-Hong, Y., and Hui-Wen, Y. (2008). Repetitive/temporal hypoxia increased P-glycoprotein expression in cultured rat brain microvascular endothelial cells in vitro. *Neurosci. Lett.* 432, 184–187.

Yaggi, H.K., Concato, J., Kernan, W.N., Lichtman, J.H., Brass, L.M., and Mohsenin, V. (2005). Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N. Engl. J. Med.* 353, 2034–2041.

Yan, J., Zhou, B., Taheri, S., and Shi, H. (2011). Differential Effects of HIF-1 Inhibition by YC-1 on the Overall Outcome and Blood-Brain Barrier Damage in a Rat Model of Ischemic Stroke. *Plos One* 6.

Yang, F., Zhou, L., Wang, D., Wang, Z., and Huang, Q.-Y. (2015). Minocycline ameliorates hypoxia-induced blood-brain barrier damage by inhibition of HIF-1 α through SIRT-3/PHD-2 degradation pathway. *Neuroscience* 304, 250–259.

Yang, M., Chen, Y., Wu, Z., Zhang, Y., Cai, R., Ye, L., Huang, Y., Wang, L., and He, H. (2018). The impact of chronic intermittent hypoxia on the expression of intercellular cell

adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor in the ischemia-reperfusion rat model. *Folia Neuropathol.* 56, 159–166.

Yao, Y., Chen, Z.-L., Norris, E.H., and Strickland, S. (2014). Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nat. Commun.* 5, 3413.

Ye, J., Liu, H., Zhang, G., Li, P., Wang, Z., Huang, S., Yang, Q., and Li, Y. (2012). The Treg/Th17 Imbalance in Patients with Obstructive Sleep Apnoea Syndrome.

Yeh, W.-L., Lu, D.-Y., Lin, C.-J., Liou, H.-C., and Fu, W.-M. (2007). Inhibition of hypoxia-induced increase of blood-brain barrier permeability by YC-1 through the antagonism of HIF-1 α accumulation and VEGF expression. *Mol. Pharmacol.* 72, 440–449.

Yokoe, T., Minoguchi, K., Matsuo, H., Oda, N., Minoguchi, H., Yoshino, G., Hirano, T., and Adachi, M. (2003). Elevated Levels of C-Reactive Protein and Interleukin-6 in Patients With Obstructive Sleep Apnea Syndrome Are Decreased by Nasal Continuous Positive Airway Pressure. *Circulation* 107, 1129–1134.

Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., and Badr, S. (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N. Engl. J. Med.* 328, 1230–1235.

Young, T., Blustein, J., Finn, L., and Palta, M. (1997a). Sleep-disordered breathing and motor vehicle accidents in a population-based sample of employed adults. *Sleep* 20, 608–613.

Young, T., Peppard, P., Palta, M., Hla, K.M., Finn, L., Morgan, B., and Skatrud, J. (1997b). Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch. Intern. Med.* 157, 1746–1752.

Yu, J., Zhou, Z., McEvoy, R.D., Anderson, C.S., Rodgers, A., Perkovic, V., and Neal, B. (2017). Association of Positive Airway Pressure With Cardiovascular Events and Death in Adults With Sleep Apnea: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 318, 156–166.

Zhang, S.X.L., Wang, Y., and Gozal, D. (2012). Pathological consequences of intermittent hypoxia in the central nervous system. *Compr. Physiol.* 2, 1767–1777.

Zhang, Y., Han, H., Elmquist, W.F., and Miller, D.W. (2000). Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* 876, 148–153.

Zhong, A., Xiong, X., Shi, M., and Xu, H. (2016). Roles of interleukin (IL)-6 gene polymorphisms, serum IL-6 levels, and treatment in obstructive sleep apnea: a meta-analysis. *Sleep Breath. Schlaf Atm.* 20, 719–731.

Zimmermann, J., Krauthausen, M., Hofer, M.J., Heneka, M.T., Campbell, I.L., and Müller, M. (2013). CNS-targeted production of IL-17A induces glial activation, microvascular pathology and enhances the neuroinflammatory response to systemic endotoxemia. *Plos One* 8, e57307.

(1999). Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The Report of an American Academy of Sleep Medicine Task Force. *Sleep* 22, 667–689.

Résumé :

Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est un enjeu majeur en santé publique. Il est défini par des collapsus répétés des voies aériennes supérieures associés à une majoration du risque cérébrovasculaire. A ce jour, le traitement le plus efficace est un dispositif de pression positive continue nocturne, dont l'observance à long terme est limitée. Afin de développer d'autres thérapeutiques, il est nécessaire de comprendre les mécanismes sous-jacents ainsi que leurs impacts au niveau du système nerveux central (SNC). Dans ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que les déficits cognitifs seraient liés à une altération de la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette barrière est composée d'un endothélium étanche, qui est associé aux cellules du compartiment cérébral tel que les astrocytes, pour permettre de limiter l'entrée et/ou de favoriser la sortie de composés cytotoxiques, protégeant ainsi le SNC. Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des protéines de jonctions telles que ZO-1 et Claudin-5. Mais elles possèdent également un système de transports d'efflux actif, appartenant à la famille des ABC-transporteurs tels que MRP-1, P-gp, BCRP. L'objectif premier de cette thèse, fut d'évaluer l'impact individuel de deux mécanismes sous-jacents du SAOS, c'est-à-dire l'hypoxie intermittente chronique par l'intermédiaire de la voie HIF-1 et l'inflammation persistante de bas grade, via l'utilisation de cytokines proinflammatoires connues pour leurs implications dans le SAOS, sur l'intégrité d'un modèle de BHE. Enfin nous avons réalisé une approche translationnelle d'étude du SAOS, grâce à l'utilisation de sérums de patients permettant de déterminer l'effet des sérums de patient sur un modèle de BHE *in vitro*. L'étanchéité de l'endothélium est évaluée par des mesures de perméabilité au Sodium fluorescéine, ainsi que des ELISA sur cellules entières d'expression des protéines de jonctions serrées et des ABC-transporteurs. Enfin une mesure de l'activité de ces ABC-transporteurs a été réalisée. Nous avons observé une perte d'intégrité de la BHE suite aux différents stress. Nous montrons que l'hypoxie intermittente chronique entraîne une possible adaptation cellulaire et que l'inhibition de la voie hypoxique ne permet pas d'annuler entièrement les conséquences de l'hypoxie sur l'intégrité de la BHE. Ainsi d'autres voies que celle d' HIF-1 interviendraient dans ce processus de perméabilité de la barrière telle que l'inflammation. Enfin notre étude confirme que les sérums de patients atteint d'un SAOS, induisent une augmentation de la perméabilité de la BHE. Ces diverses observations confirment la complexité du SAOS, et l'importance de l'étude des mécanismes individuels pour la recherche de nouvelles thérapeutiques.

Mots clés : Barrière hématoencéphalique – modélisation *in vitro* – syndrome d'apnée obstructive du sommeil – jonctions serrées – ABC-transporteurs.

Abstract:

Obstructive sleep apnea syndrome (OSA) is a major public health issue. It's defined as repeated upper airway collapse associated with enhanced cerebrovascular risk. Nowadays, the most effective treatment is a continuous positive airway pressure device, but long term compliance could be limited. In order to develop alternative therapies, it appears necessary to better understand the underlying deleterious mechanisms and their impacts on the central nervous system (CNS). In this thesis we hypothesize that neurodegenerative consequences of OSA are mainly related to an alteration of the blood-brain barrier (BBB). This barrier is composed of a tight endothelium, which is combined with brain compartment cells such as astrocytes, to limits the entry and/or promotes the exit of cytotoxic compounds, thus protecting the CNS. The first objective of this topic was to assess the individual impact of two underlying mechanisms of OSA, i.e. chronic intermittent hypoxia and persistent low-grade inflammation on the integrity of an *in vitro* BBB model. Finally, we have evaluated a "global" approach to OSA using patient sera to determinate the effect of circulating biomarkers on an *in vitro* BBB model. The tightness of the endothelium is evaluated by Na-Fl permeability measurements, as well as cell-ELISA for tight junction proteins and ABC-transporters expression. Finally a measurement of ABC-transporters activity was performed. We demonstrate a loss of BBB integrity due to different stresses. We show that intermittent hypoxia leads to cellular adaptation and the use of an inhibitor of the main recognized HIF-1 alpha pathway does not induce a complete reversion on the integrity of the BBB. Then, other pathways would be involved in BBB alteration, such as inflammation. Therefore, we show inflammatory stress apply to our *in-vitro* BBB model lead a loss of integrity. Finally, we demonstrate that patient's sera with severe OSA induce an increase in the permeability of our human BBB model. Those results confirm the complexity of OSA pathophysiology, and the importance of studying individual mechanisms for the search of new therapies

Keywords: Blood-brain barrier model – obstructive sleep apnea syndrome – tight junction – ABC-transporter